

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Determinación de la actividad regeneradora en eritema
solar de un gel cosmético a base del extracto de
diclorometano de flores de Iresine Weberbaueri (flor
blanca)**

TESIS

**Para optar al Grado Académico de Magíster en Ciencias Farmaceuticas
con mención en Ciencia y Tecnología Cosmética**

AUTOR

Marianella Isabel Guevara Castilla

ASESOR

Pablo Bonilla Rivera

Lima – Perú

2011

El presente trabajo de investigación está dedicado a todos mis colegas y compañeros de estudios de la Maestría, con quienes compartí momentos inigualables, y de los cuales aprendí durante los dos años de estudio.

Agradezco a Dios por ser Él, la
guía y camino durante toda mi
vida.

A mis padres Isabel y Arnaldo, por su
amor y lucha permanente de
conducir a sus hijos hacia el logro de
sus metas.

A mis hermanos Gabriela, Juan
Arnaldo, Maricarmen y Alfonso por
su apoyo y comprensión.

A mi asesor: Pablo Bonilla por su
incondicional labor docente.

Gracias a él, por la realización de
esta tesis.

RESUMEN

Iresine weberbaueri, es una especie vegetal muy conocida en Medicina Tradicional, ya que es usada como potente desinflamante. Fue recolectada en La Oscurana, Caserío el Nogal, Pueblo de Bolívar, provincia de San Miguel de Pallaques, departamento de Cajamarca, en el mes de enero de 2008.

El screening fitoquímico del extracto etanólico de las flores de *Iresine weberbaueri* reportó la presencia de metabolitos secundarios, tales como: taninos, flavonoides, alcaloides, glicósidos y compuestos fenólicos. Se realizó la partición del extracto etanólico con solventes de diferente polaridad, obteniéndose extractos de: n-hexano, diclorometano, metanol y acuoso. El estudio biológico se basó en el Bioensayo para evaluar el efecto regenerador en eritema solar de los extractos obtenidos, con una concentración de 15% en propilenglicol, por vía dérmica, determinada en ensayos biológicos preliminares, determinándose como el más activo el extracto de diclorometano, tanto en la evaluación clínica como en el reporte histológico. Los extractos obtenidos fueron desarrollados en forma de gel cosmético y fueron estudiados mediante el bioensayo para evaluar el efecto regenerador en eritema solar, con una concentración de 15 %, en una base de gel constituida de agua, extracto, trietanolamina, carbopol 940, metilparabeno y propilparabeno, por vía dérmica, determinándose como el más activo el gel a base del extracto de diclorometano, tanto en la evaluación clínica como en el reporte histológico.

Se realizó el bioensayo de forma comparativa entre el gel a base del extracto de diclorometano frente al efecto presentado por el gel cosmético "after sun", los cuales presentaron un resultado similar en cuanto al reporte histológico.

Se realizó ensayos físico químicos para determinan sus características, obteniéndose que presenta un aspecto de gel viscoso con color natural otorgado por el extracto, el valor de pH resultó 6,5, la viscosidad resultó 61 000 cP.

Se realizó ensayos microbiológicos obteniéndose que el sistema preservante fue el adecuado para este tipo de formulación.

Palabras clave: Bioensayo, efecto regenerador epitelial, flavonoides, producto after sun, eritema solar.

ABSTRACT

Iresine weberbaueri is a well known plant species in traditional medicine as it is used as a powerful anti-inflammatory.

It was collected in Oscurana, Bolivar village, province of San Miguel de Pallaques, department of Cajamarca, in January 2008.

The phytochemical screening of ethanolic extract of flowers *Iresine weberbaueri* reported the presence of secondary metabolites such as tannins, flavonoids, alkaloids, glycosides and phenolic compounds.

It performed partition ethanolic extract with solvents of different polarity, yielding extracts: n-hexane, dichloromethane, methanol and water.

The study was based on the biological Bioassay to evaluate the regenerative effect of solar erythema in the extracts obtained with a concentration of 15% propylene glycol, by the dermal route, as determined in preliminary biological assays, determined as the most active extract, dichloromethane, both in the clinical evaluation and in the histological report.

The extracts obtained were developed in the form of cosmetic gel and were studied by bioassay to evaluate the regenerative effect in solar erythema, with a concentration of 15% in a gel base consisting of water, extract, Triethanolamine, Carbopol 940, and methyl Propylparaben, by the dermal route, determining the most active gel-based extract of dichloromethane, both in the clinical evaluation and in the histological report.

Bioassay was conducted by comparing gel-based extract of dichloromethane versus the effect produced by the gel cosmetic after-sun ", which presented a similar result as to the histological report.

It performed tests to determine their physical chemical characteristics, which has obtained a viscous gel with natural color given by the extract, the pH value was 6.5, the viscosity was 61 000 cP.

Microbiological testing was performed to obtain the preservative system was suitable for this type of formulation.

Key words: Bioassay, epithelial regenerative effect, flavonoides, after sun product, solar erithema.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
 CAPÍTULO I : GENERALIDADES	 3
1.1. <i>Iresine weberbaueri</i> Suess.	4
1.1.1. Clasificación taxonómica.	4
1.1.2. Descripción Morfológica.	5
1.1.3. Ubicación geográfica.	6
1.1.4. Usos en la medicina popular.	7
1.2. Flavonoides.	8
➤ Características físico químicas de flavonoides	9
➤ Características biológicas de los flavonoides	9
➤ Ruta biogenética de flavonoides	10
➤ Chalconas	11
➤ Auronas	12
➤ Flavonoles y favonas	13
➤ Antocianidinas	14
➤ Flavanonas	15
➤ Flavanoles	16
➤ Isoflavonoides	17
1.3. Anatomía y Fisiología de la piel.	18

1.3.1. Anatomía	19
1.3.1.1. Anatomía	19
1.3.1.2. Fisiología	20
1.3.2. Radiación UV	25
1.3.3. Daño solar	26
1.3.4. Eritema solar	32
1.4. Productos cosméticos “after sun”	34
1.5. Técnicas utilizadas en el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios	35
1.5.1. Cromatografía	35
CAPÍTULO II : MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS	38
2.1. Materiales.	
2.1.1. Material botánico.	39
o Recolección y selección de la muestra.	39
o Secado y conservación.	39
2.1.2. Material biológico.	39
2.1.3. Material de laboratorio y reactivos.	40
2.2. Estudio fitoquímico.	41
2.2.1. Obtención de extractos.	41
2.2.2. Screening fitoquímico del extracto etanólico.	42
2.2.3. Identificación de metabolitos secundarios.	42
2.2.4. Identificación de metabolitos secundarios del extracto de diclorometano de la parte de flores de <i>Iresine weberbaueri</i> Suess.	43

2.2.5. Bioensayo para evaluar el efecto regenerador solar de los extractos de <i>Iresine weberbaueri</i>	45
2.2.6. Bioensayo para evaluar el efecto regenerador solar de la formulación en gel de los extractos de <i>Iresine weberbaueri</i>	46
2.2.7. Análisis para determinar las propiedades físicoquímicas de la formulación en gel de extractos de <i>Iresine weberbaueri</i>	50
2.2.8. Análisis para determinar las propiedades microbiológicas de la formulación en gel de extractos de <i>Iresine weberbaueri</i>	52

CAPÍTULO III : RESULTADOS

3.1. Del estudio fitoquímico.	56
3.2. Del estudio biológico.	57

DISCUSIÓN	71
------------------	-----------

CONCLUSIONES	74
---------------------	-----------

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
-----------------------------------	-----------

ANEXOS	79
---------------	-----------

INTRODUCCIÓN

Se calcula que el Perú posee unas 25 000 especies de plantas conocidas, de las cuales cerca de 5354 especies vegetales son endémicas, y de éstas 1400 especies son usadas por sus propiedades medicinales.¹

Dentro de estas últimas se encuentra *Iresinee weberbaueri* Suess, la cual posee una importante propiedad antiinflamatorio a nivel dérmico y de mucosas.

En el Perú durante la temporada de verano, entre el 30% y 40% de las consultas dermatológicas que se brindan en los diferentes establecimientos de salud son por problemas a la piel causados por la excesiva exposición al sol.²

Para determinar la actividad de las personas en su protección frente a la radiación ultravioleta se realizó una encuesta a 190 personas, de las cuales se obtuvo la siguiente información: el 43.2% usó protector solar en los últimos 6 meses, de los cuales el 54.3% lo usó “algunas veces” y sólo el 6.2% lo usó “siempre”. De 126 internos que respondieron a la pregunta “en que parte de su cuerpo usa protector solar”, el 64.3% lo usa “en toda la zona expuesta”. Entre los internos que usaron protector solar el 55.5% respondieron que usan SPF mayor de 30, además el 31.6% se aplica el protector entre 15 a 30 minutos antes de la exposición. De los encuestados que van a la playa regularmente, el 27.4% expresó que se expone al sol entre 2 y 4 horas, mientras que el 17.8% se expone por más de 4 horas.

En general, sólo el 17.4% tuvo prácticas adecuadas.³

Según estos datos, nos hacemos la siguiente pregunta, ¿Qué alternativa tienen la mayoría de las personas que no usaron adecuadamente un protector solar y que obtuvo como consecuencia un eritema solar?

Es por ello que los pobladores del Caserío El Nogal (Cajamarca), hacen uso de las plantas medicinales para el tratamiento de sus afecciones dérmicas. Una de las plantas usadas por ellos es la flor blanca o *Iresinee weberbaueri* Suess que es utilizada desde hace varias décadas.

A *Iresinee weberbaueri* Suess se le atribuyen virtudes terapéuticas. Teniendo como uso popular más común: antiinflamatorio y calmante de afecciones de mucosas y dermis, considerando importante por los pobladores dicho efecto. Dicho efecto calmante puede deberse a una actividad regeneradora dérmica.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivos específicos: obtener el extracto flavonoideo de las flores de *Iresine wberbaueri* “flor blanca”, formular un producto dermocosmético a base del extracto flavonoideo de *Iresine weberbaueri* “flor blanca”, realizar análisis físico químicos del producto demrocosmético, realizar análisis microbiológicos del producto dermocosmético, determinar la actividad regeneradora mediante el método UVB-induced cutaneous erithema, determinar la actividad regeneradora mediante análisis histológico en la piel del lomo de los ratones

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1. *Iresinee weberbaueri* Suess

1.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

División	:	MAGNOLIOPHYTA
Clase	:	MAGNOLIOPSIDA
Orden	:	CARYOPHYLLIDAE
Familia	:	AMARANTHACEAE
Género	:	<u><i>Iresinee</i></u> P. Browne
Especie	:	<u><i>Iresinee weberbaueri</i></u> Suess.

La clasificación botánica fue realizada por el Biólogo José Ricardo Campos de la Cruz. **ANEXO N°01**



Figura N° 1 : *Iresinee weberbaueri* Suess

1.1.2. Descripción Morfológica. ^{4,5}

Amaranthaceae son hierbas en su mayoría, pero también raramente arbustos o árboles pequeños (comprende 65 géneros y 900 especies entre arbustos y árboles), se caracterizan por la presencia de betalaínas y p - plásmidos. Las hojas son alternas u opuestas, simples. Las flores son bisexuales o unisexual, generalmente muy pequeñas, y a menudo espinosas debido a brácteas. Cada flor es sostenida por una bráctea que es membranosa. Un sépalo también está presente. El androceo consta normalmente de 5 estambres y que, en general, están unidos por una parte o la totalidad de su longitud en un tubo membranoso o corona, como una estructura, a veces con apéndices entre las anteras. El pistilo compuesto de un ovario locule que contengan uno o, a veces, varios óvulos basales. El fruto suele ser una cápsula utrículo o circumcisa.

Químicamente esta familia es rica en glicósidos flavónicos, glicósidos cardiotónicos, poseen también saponinas, raramente esencias o materias grasas. Esta especie es llamada vulgarmente “flor blanca”, planta blanca”, “cedrón”.

1.1.3. Ubicación geográfica.⁶

La especie *Iresinee weberbaueri* se encuentra ubicada geográficamente en el bosque relicto húmedo de La Oscurana, Caserío El Nogal, a 9 km del pueblo de Bolívar, distrito de Bolívar, provincia de San Miguel de Pallaques (Departamento de Cajamarca)

Este ecosistema está ubicado sobre un acantilado rocoso-escarpado, debajo de la catarata «El Chivo» y es cruzado por la quebrada del mismo nombre proveniente de Niepos, la cual ayuda a mantener la humedad, coadyuvado por las nubes que lo cubren gran parte del año y las lluvias estacionales. El área estudiada presenta una inclinación de 35% de pendiente y tiene 65 hectáreas de extensión.



**Figura Nº 2: Ubicación geográfica de la distribución
de *Iresinee weberbaueri* Suess**



Figura N° 3: Vista panorámica del bosque de La Oscurana

1.1.4. Usos en la medicina popular.

La especie *Iresinee weberbaueri* presenta usos en medicina popular como antiinflamatorio, analgésico de vías urinarias.

1.2. **Flavonoides** ^{7, 8,9}

Los flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos, sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos, bacterias, los compuestos fenólicos que principalmente se encuentran son: quinonas y xantonas y a éstos se debe su color.

Se conocen diez clases de Flavonoides, todos contienen quince átomos de carbono en su núcleo básico, y están arreglados bajo el sistema C6 - C3 -C6.

La estructura general de los Flavonoides comprende un anillo A derivado de la cadena policétida (sustitución en patrón meta), un anillo B, derivado del ácido Shikímico, con sustitución en orto, los dos anillos aromáticos llamados A y B están unidos por una unidad de tres carbonos que pueden o no formar un tercer anillo que en caso de existir es llamado anillo C, correspondientes a la parte alquílica del fenilpropano.

La acción farmacológica es también extensa y variada, bien conocidas son sus actividades, contra la fragilidad capilar (bioflavonoides del género Citrus: rutina y derivados) dilatadores de las coronarias (proantocianidinas de Crataegus, Árnica y Ginkgo), espasmolítica (glicósidos de apigenina), antihepatotóxica (silimarina de Silybum), colerética, estrogénica y diurética.

Los flavonoides se encuentran generalmente en mezclas como agliconas y/o glicósidos de las diferentes clases siendo más común; en muchos casos debido a la complejidad de la mezcla es más frecuente el estudio de estos compuestos en forma de agliconas en extractos de plantas, las más comunes son las flavonas y flavonoles, y más restringidas en su ocurrencia las isoflavonas, las chalconas y auronas.

➤ Características físico químicas de los flavonoides:

Los flavonoides presentan diferentes grados de solubilidad: agua, etanol, metanol (compuestos con grupo hidroxilo libres y glicósidos), acetato de etilo, cloroformo, éter etílico (agliconas esterificadas); se caracterizan por su carácter fenólico y debido a que contienen un sistema aromático conjugado muestran una intensa absorción de bandas en el espectro UV/VIS, lo cual nos permite realizar un estudio cualitativo y cuantitativo de estos compuestos.^{7,10}

Los espectros metanólicos de flavonoides exhiben dos picos máximos de absorción que comúnmente son referidos a banda II (240-285nm) y banda I (300-550 nm). La banda I se considera está asociada con la absorción debido al anillo B sistema cinamoilo y la banda II con la absorción que involucra al anillo A, sistema benzoilo.

El espectro metanólico, particularmente la posición de la banda I, provee información acerca del tipo de flavonoide.^{11,12}

➤ Características biológicas de los flavonoides:

Los flavonoides son clasificados como antioxidantes, los cuales se definen como sustancia que, a bajas concentraciones en comparación con el sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de dicho sustrato.

La importancia de un antioxidante depende de su concentración, del medio donde actúa y de su habilidad para interaccionar con sistemas regeneradores.

Actualmente se cree que ciertas enfermedades como el cáncer, envejecimiento, etc., podrían estar unidas al fenómeno de la oxidación celular mediada por radicales libre.

Los flavonoides están clasificados dentro del grupo de antioxidantes como “antioxidantes no nutrientes”, los cuales se definen como compuestos fenólicos entre los que destacan los bioflavonoides.¹³

➤ Ruta biogénica de Flavonoides^{7,8}.

Los flavonoides se forman biogénicamente a través de la ruta del shikimato y del acetato malonato, siendo la chalcona el flavonoide inicialmente formado, como se muestra en la figura N° 04, y a partir del cual se derivan las otras clases por posterior modificaciones que ocurren en varias etapas. Así mismo cada una de estas clases puede sufrir posteriores metilaciones, isoprenilaciones o glicosidaciones de los grupos hidroxilados; metilenciones de grupos o-hidroxilos, dimerizaciones.

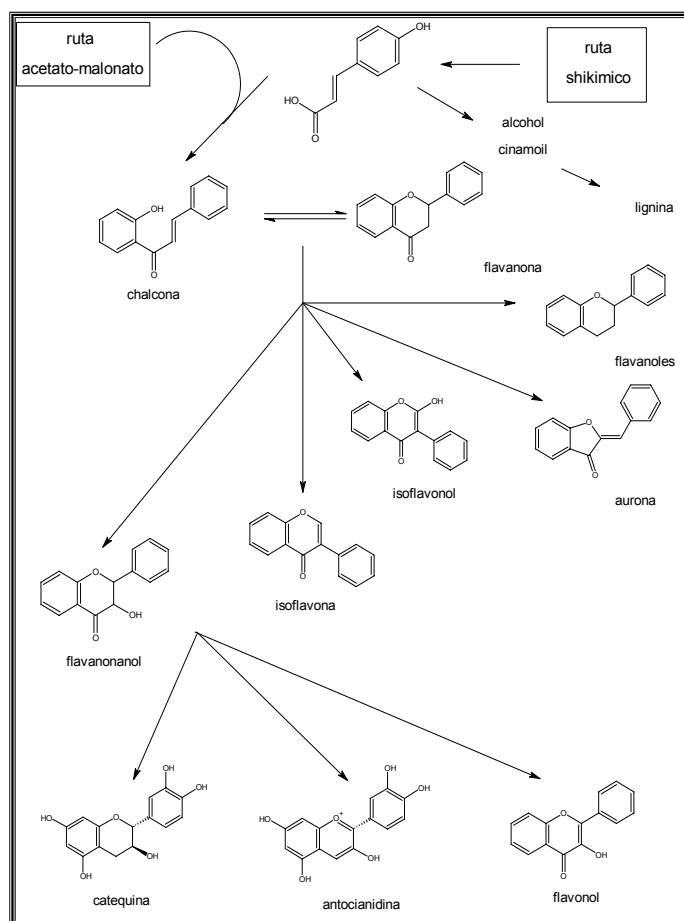
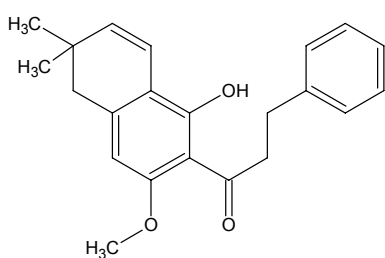


FIGURA N°04: Ruta biogénica de flavonoides

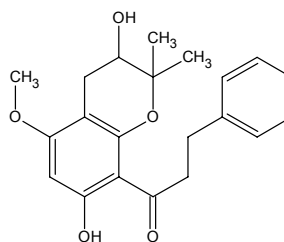
➤ CHALCONAS

Las chalconas se encuentran solamente en algunas familias botánicas. Aquellas que contienen al anillo A hidroxilado en C-2 y C-4 están prácticamente confinadas a las compuestas y son responsables de la pigmentación amarilla de sus flores.

La actividad biológica de este grupo está poco estudiada, pero cabe mencionar el glucósido de la floretina: florizina, ampliamente distribuido en la corteza de los frutos de varias rosáceas; produce un aumento de la excreción urinaria de la glucosa y el fenómeno se conoce como “diabetes de la floretina” que se caracteriza por una glucosuria causada por interferencia en la reabsorción de la glucosa por los túbulos renales.

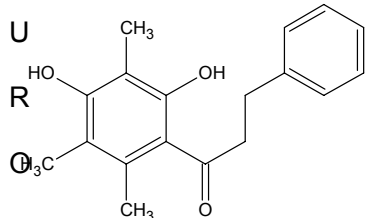


Pongachalcona-I
(Pongemia glabra)

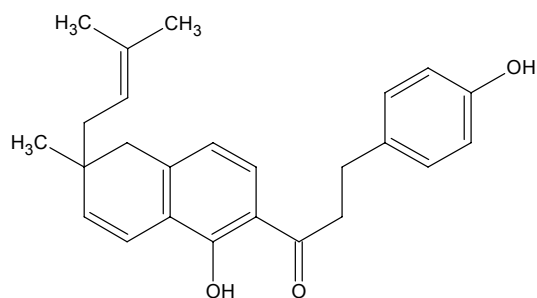


(Helichrysum cymosum)

➤ A



N
(Myrica gale)
A

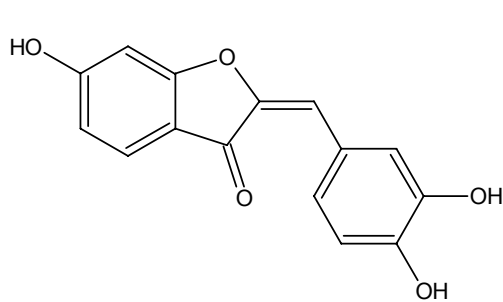


Lesped
(Lespedeza cyrtobotrya)

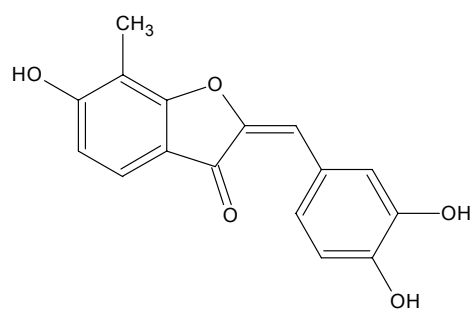
➤ AURONAS

Las auronas se forman probablemente, a partir de las chalconas por ciclación oxidativa con el C-2.

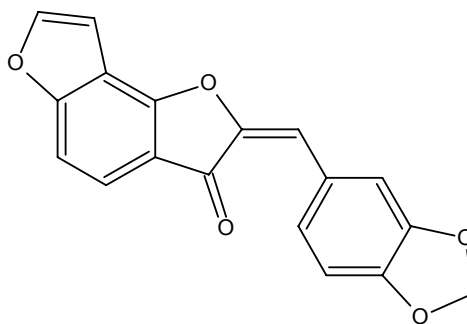
Su distribución natural no tiene un orden establecido y como en otros compuestos fenólicos se encuentran ejemplos de glicosación y alquilación en el anillo A.



Sulfuretina



Maritimetina

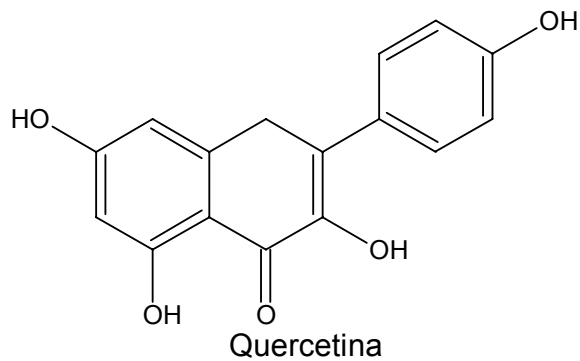
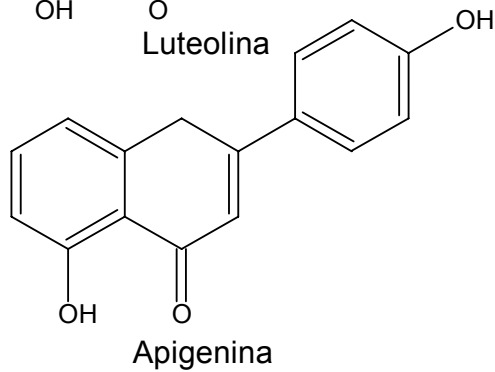
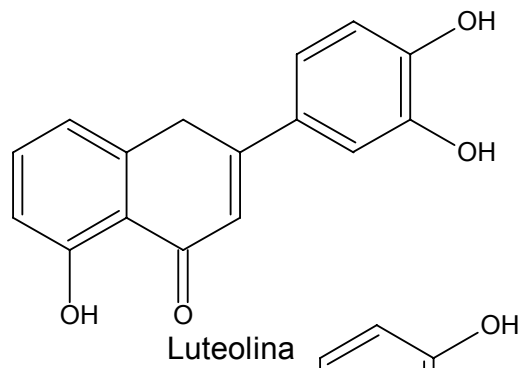


Furanoaurona A

➤ FLAVONOLES Y FLAVONAS

Los representantes más abundantes de los flavonoides naturales son las flavonas y los flavonoles.

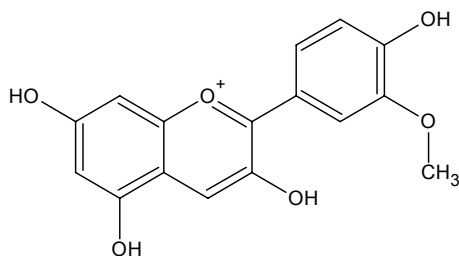
Los compuestos más frecuentes de estos grupos son: apigenina y apiña (7-O-apioglucósido), luteolina y sus glicósidos, quercetina (de mayor abundancia) y rutina (3-O-rutinósido), kamferol y sus glicósidos.



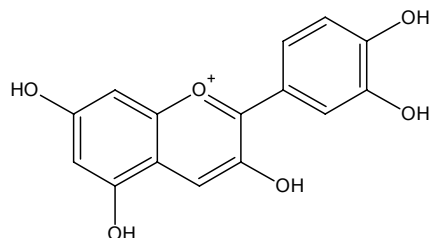
➤ANTOCIANIDINAS

Constituyen los pigmentos principales de las flores y de las hojas de otoño, sus colores van desde el rojo hasta el azul. Sus glicósidos de polihidroxiavililio, en los cuales la unión glicosídica está principalmente en C-3.

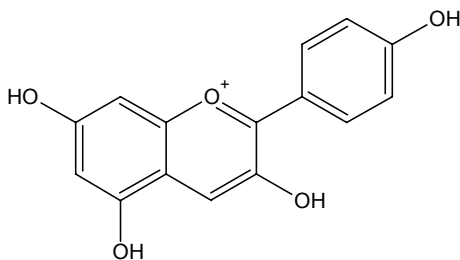
Las antocianidinas representan un factor importante en la industria alimenticia debido a las restricciones sanitarias hacia el uso de colorantes sintéticos. En el mercado existen algunas patentes que permiten extraer y estabilizar las estructuras naturales de antocianidinas para ser usadas en la fabricación de colorantes alimentarios y por ello se patrocinan varios estudios dedicados a la búsqueda de nuevas fuentes vegetales ricas en antocianidinas, entre las cuales se encuentra el repollo, fresas, uvas, ciruelas, etc.



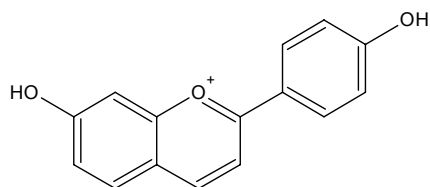
Peonidina



Pelargonidina



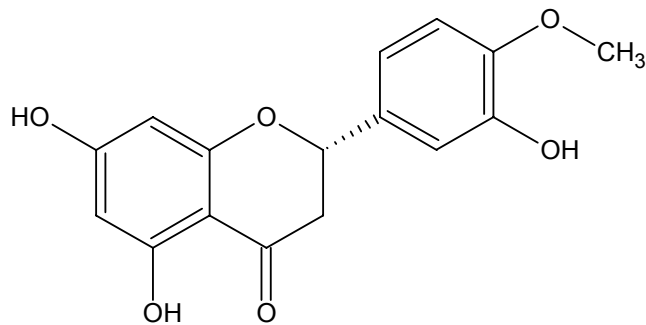
Cianidina



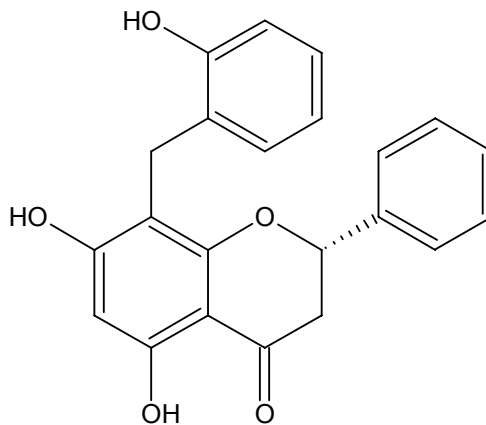
Apigenina

➤ FLAVANONAS Y FLAVANONOLES

Estos flavonoides tienen como característica la saturación del anillo C (anillo heterocíclico). Las agliconas más representativas son hesperetina y naringenina.



Hesperitina

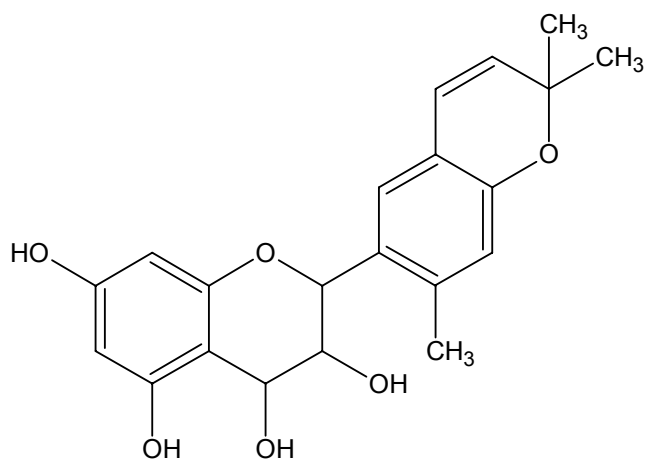


Uvaretina

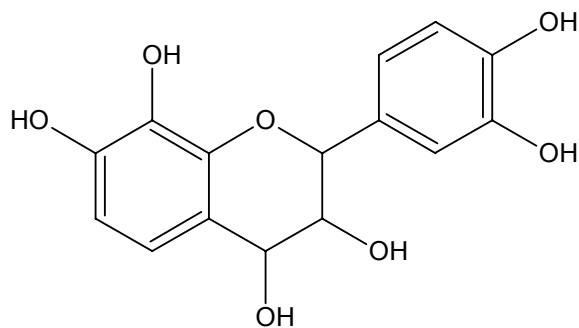
Algunas flavanonas y dihidroflavonoles inhiben el crecimiento larval de *Heliothis zea*, una plaga del maíz, entre ellos el eriodictiol, la dihidroquercetina (taxifolina) y su 3-O-ramnósido, pero la naringenina o la hesperetina no son activas, la uvaretina es citotóxica.

➤ FLAVANOLES

El modelo con el esqueleto de flavano con uno o dos grupos OH en el anillo heterocíclico se conoce como flavanoles; hay así, flavan-3,4-dioles, flavan-4-oles y flavan-3-oles, leucoantocinidinas y catequinas.



Sophoronol

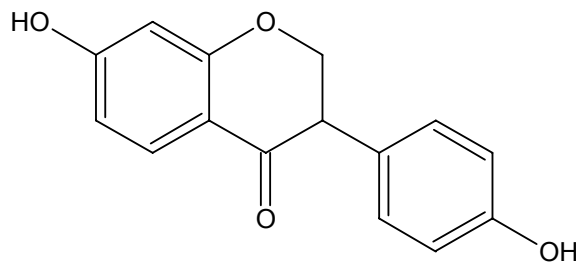


Leucofisetidina

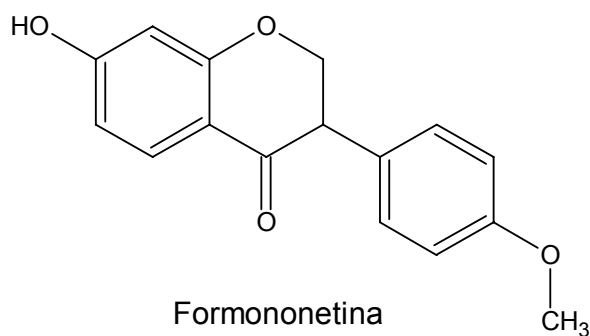
➤ ISOFLAVONOIDES

Su esqueleto puede relacionarse al 3-fenilcromano, son distribuidos en pocas familias, probablemente debido a un sistema enzimático responsable de su bioformación, muy especializado. Se encuentran principalmente en la subfamilia Papilionideas de las Leguminosas.

Estructuralmente se pueden dividir en varias clases de acuerdo a los niveles de oxidación del anillo central y a la complejidad del esqueleto, como por ejemplo la formación de otros heterociclos. Se dividen en: Isoflavonas, isoflavanonas, rotenoides, pterocarpanos, cumestanos, isoflavanos, isoflavenos.



Diazdeína



Formononetina

1.3. Anatomía y Fisiología de la piel.¹⁴

1.3.1. Anatomía.

1.3.1.1. Anatomía

La piel es relativamente compleja en estructura. Presenta cuatro capas: la epidermis (la capa más externa), la dermo-epidermis (en conjunto con la membrana basal), la dermis y la hipodermis.

- La epidermis: es la capa más externa, y está compuesta por dos tipos de células: los **keratinocitos** (la mayoría), los cuales son los responsables de la producción de keratina (proteína encargada de la formación del estrato córneo y constituye un tipo de “esqueleto” de la piel), y las **células dendríticas**.

La función base de los **keratinocitos** consiste en la división y diferenciación celular. Las células son constantemente divididas y esto crea a las células hijas. Estas células hijas ascienden progresivamente hacia la capa de células más externas. Durante este ascenso las células van cambiando morfológicamente. La epidermis está compuesta a su vez por cuatro capas del fondo hacia la superficie:

Capa basal o germinativa: esta capa consiste de células que están constantemente dividiéndose para crear células hijas las cuales ascenderán hacia la capa más externa de células de la epidermis. La capa basal está compuesta de las células recién creadas. Son de forma cilíndrica con un núcleo alargado. Estas células son unidas a la membrana basal por pequeñas protuberancias, los hemidesmosomas. Las células basales se

dividen en constante y regular manera, resultando en una completa renovación de la epidermis en aproximadamente 1 mes de tiempo.

Capa espinosa: llamado así por la presencia de dermosomas, los cuales mantienen las células juntas como pequeñas espinas. Esta capa consiste de un número variable de capas: de 3 a 4 en los ojos y de 10 a 20 en las palmas. Estas células son poligonales y tienen un núcleo largo.

Capa granular: llamado así por la cantidad de gránulos largos encontrados en el citoplasma de estas células. El estrato granuloso varía en grosor de acuerdo a su localización.

Capa lúcida: esta capa no siempre está presente. Es descrita como una capa clara.

Capa cornea: está formada de una capa en la cual las estructuras de las células han sido irreconocible. Las células se encuentran bajo completa queratinización. La parte base de la capa córnea tiene una función protectora importante. Esto significa que las sustancias tóxicas, alérgenos y microorganismos son bloqueados en este nivel y no pueden penetrar en el cuerpo.

Las **células dendríticas**, en su citoplasma forma brazos o dendritos que van entre los keratinocitos.

- La dermo-epidermis: esta zona es sinuosa. Es unida a la epidermis por los hemidesmosomas por un lado, y a la dermis por fibrilas.

La capa intermedia asegura una firmeza entre la dermis y la epidermis y también regula ciertas interacciones entre estos dos componentes.

- La dermis: Comprende dos secciones:

La dermis papilar, localizada justo debajo de la epidermis. Esta parte de la dermis tiene numerosos capilares y varias terminaciones nerviosas.

La dermis reticular, esta es la más delgada y más sólida de la dermis y está compuesto por colágeno y fibras de elastina. La dermis contiene células, fibras, sustancia intermedia, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, nervios, fibras musculares y anexos de la piel.

1.3.1.2. Fisiología

La piel juega un rol importante en el rol fisiológico en toda la vida de una persona. Este rol fisiológico es esencialmente el de protección del organismo. La piel es una barrera estructurada y continuamente adaptable entre la parte interna del organismo y del exterior. El estado patológico de la piel es lógicamente por agresiones internas o externas.

Se pueden distinguir tres funciones importantes de la piel:

- Protección
- Termorregulación
- Órgano sensorial

Protección:

Entre estas existen:

Protección mecánica: esta protección es resultado de la anatomía de la piel:

La **epidermis** está formada de células localizadas firmemente y es cubierta por una capa córnea, la cual está formada por una capa de keratina. La keratina es una proteína compleja la cual forma fibras, que forman caminos específicos: éstos son casi perpendiculares a la capa dermo-epidérmica, pero cerca a la superficie ellos corren prácticamente paralelos a la superficie de la piel. El grosor de la capa córnea también juega un rol de protección.

La **dermis** también juega una parte importante en la protección mecánica. Contiene una sustancia viscosa, la matriz, la cual con paquetes de colágeno constituyen el soporte de la piel.

La **hipodermis** contiene bastantes lóbulos bien desarrollados de grasa, de hecho como un tipo de cojín para proteger al órgano en la parte más basal contra agresiones externas.

Protección contra la radiación ultravioleta:

Los rayos ultravioletas son dañinos. Ellos dañan al núcleo de la célula. La protección contra los rayos UV es referida al pigmento celular o melanocitos. Los melanocitos, los cuales están localizados en la capa celular basal, son células dendríticas, ellos

tienen dendritos los cuales penetran entre los keratinocitos y los tatúan con el pigmento melanina.

La melanina es sintetizada en el melanocito, comenzando de la amina ácido tirosina, bajo la influencia de la enzima llamada tirosinasa.

Bajo la influencia de la tirosinasa, la tirosina es oxidada a dihydroxyphenylalanina o DOPA, esta sustancia luego, bajo una serie de reacciones de oxidación y polimerizaciones, eventualmente producen melanina. La epidermis contiene aproximadamente 2 000 melanocitos por mm² de piel. Este número es constante en todas las razas.

Cuando nosotros exponemos la piel a un baño de sol, suceden dos estados:

La pigmentación inmediata, la cual sucede durante la exposición a la radiación UV, la cual tiene su pico después de las 6 a 8 horas y desaparece después de 24 horas. Esta pigmentación no es resultado de un incremento de la síntesis de melanina, pero si de una estimulación del llamado “tatuaje de keratinocitos”.

La pigmentación atrasada, tiene lugar aproximadamente 48 horas después de la exposición a la radiación UV y resulta de un incremento de la síntesis de la melanina en el melanocito combinado con un incremento del tatuaje de los keratinocitos. El pigmento de melanina marrón absorberá los rayos UV, reduciendo así significativamente el daño de los rayos UV.

Protección contra la penetración de microorganismos y sustancias químicas:

La piel también protege al organismo contra la penetración de microorganismos (bacterias y hongos) y de sustancias químicas.

Esto es logrado por la capa hidrolipídica y por la capa córnea.

La capa hidrolipídica, cubre la piel. Esta capa está formada por secreción oleosa de las glándulas sebáceas por un lado, y secreción acuosa de las glándulas sudoríparas por otro lado.

La mezcla de estas dos secreciones produce una emulsión de agua en aceite: la capa hidrolipídica, la cual tiene un rango de pH de 4,2 a 5,6.

Las glándulas sebáceas están formadas por células largas llenadas con pequeñas gotas de aceite. Estas gotas de aceite están hechas de grasa neutra, no de ácidos de grasa libre.

Bajo la capa hidrolipídica se encuentra la llamada **capa barrera o capa cornea**, la cual tiene un grosor de 10 a 15 um formado por células muertas empaquetadas densamente. La capa cornea forma una pared verdadera, en la cual los keratinocitos son los ladrillos y la capa hidrolipídica es el cemento. Esta estructura bloquea los microorganismos y las sustancias químicas en la superficie de la piel. Naturalmente esta barrera no es 100% impermeable.

Protección celular contra agresiones internas y externas:

Células localizadas en la epidermis (células de Langerhans) y la dermis también contribuyen a la protección celular de una persona. Las células polinucleares (“las asesinas”) y los macrófagos (“los comensales”) localizarán, atacarán y tratan de neutralizar a los atacantes.

Termorregulación:

La homeotermia, el mantenimiento de una temperatura constante en el cuerpo, está asegurado por las glándulas sudoríparas ecrinas, los lóbulos de grasa y los vasos sanguíneos de la piel.

El número de glándulas sudoríparas ecrinas es de $2 \text{ a } 5 \times 10^6$. Bajo condiciones normales ellos eliminan aproximadamente 600 mL de agua cada 24 horas, las cuales corresponden al 25% del total de pérdida de fluidos en un día. Algunas veces estas pérdidas de fluido pueden aumentar a 2 litros por hora. Funcionalmente las glándulas sudoríparas ecrinas están reguladas por los nervios parasimpáticos:

Ellos son estimulados por acetilcolina y pilocarpina.

Ellos son inhibidos por atropina y otros anticolinérgicos.

Los vasos sanguíneos también forman un rol importante, ellos se expanden (vasodilatación) para perder calor, y se contraen (vasoconstricción) para preservar el calor.

Órgano sensorial:

La piel es un órgano sensorial y de contacto. Las fibras nerviosas presentan terminaciones, ellas entran en contacto con las células de Merkel de la epidermis, como los melanocitos, están localizadas en la capa basal de la epidermis. Las fibras nerviosas pueden también presentarse encapsuladas, como los corpúsculos de Vater-Pacini (sensaciones de presión y vibración), los corpúsculos de Meissner (sensación de tacto). Las fibras nerviosas dan sensaciones de tacto, presión, frío, calor, y dolor.

1.3.2. Radiación UV:¹⁵

El sol proporciona un cierto número de radiaciones llamadas radiaciones actínicas. No todas llegan al suelo. Las radiaciones que recibimos se distribuyen de la siguiente manera:

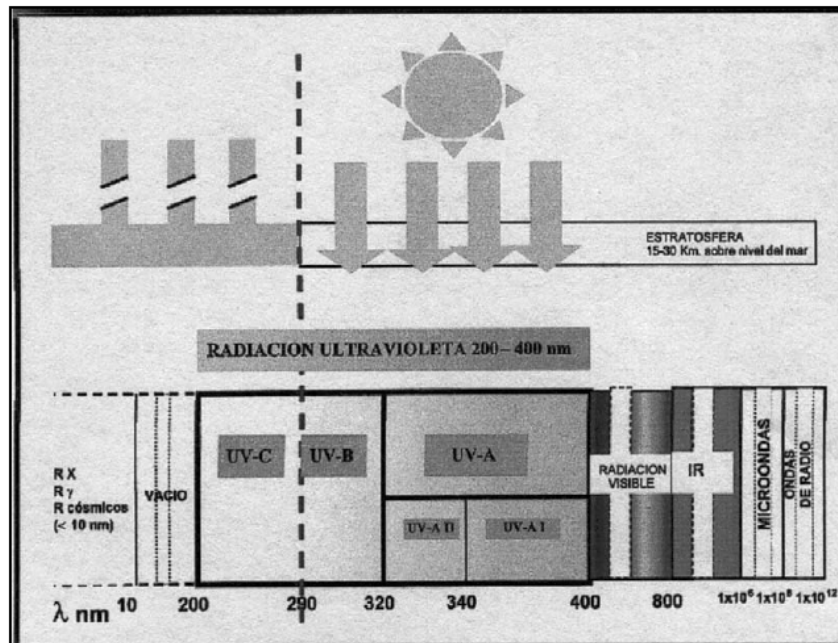


Figura N°5: Radiaciones electromagnéticas emitidas por el sol

Los UV C y las longitudes de onda más cortas son retenidos por la capa de ozono. Sólo llegan a nivel del suelo alrededor del 2%.

Los UV A y B representan alrededor del 12% de las radiaciones actínicas incidentes. Este tipo de longitudes causan en la piel un daño actínico, el cual entendemos como las lesiones cutáneas producidas por las radiaciones que llegan a la superficie terrestre: UV-B (290-320nm), UV-A (320-400nm) y radiación visible hasta 515 nm.

Penetración de la radiación solar en la piel: ¹⁶

- A pesar de la capa cornea y de la melanina, una parte de la radiación solar penetra en las distintas capas de la piel.
- La penetración es función de la longitud de onda de las distintas radiaciones.
- Cuanto mayor es la longitud de onda de una radiación, penetra más profundamente en la piel.

Entonces, aunque la piel posee un sistema de defensa natural frente a las radiaciones solares que se manifiesta con la producción de melanina, pigmento fotoprotector que se encarga del bronceado de la piel, muchas veces no es suficiente, por lo que es necesaria una protección adicional.

1.3.3. Daño solar: ¹⁷

Los parámetros fotobiológicos precedentes, son determinantes de tipo, intensidad y trascendencia del daño actínico resultante:

UVB (290-320 nm):

- ❖ Quemadura (eritema) solar.
- ❖ Inmunosupresión.
- ❖ Cánceres cutáneos.
- ❖ Dermatitis actínica en pieles fotosensibles.
- ❖ Reacciones fototóxicas y fotoalérgicas.

UVA (320-400 nm)

- ❖ Fotoenvejecimiento cutáneo.
- ❖ Inmunosupresión.
- ❖ Cánceres cutáneos.
- ❖ Cataratas.
- ❖ Reacciones fototóxicas y fotoalérgicas.
- ❖ Dermatitis actínicas en pieles fotosensibles.
- ❖ Daño aditivo al producido por UV-B especialmente por UVA II.

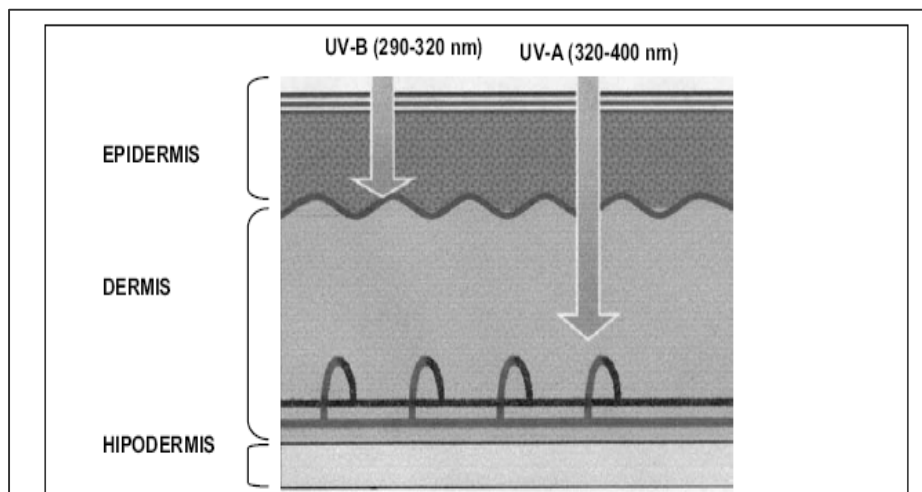


Figura Nº 6: Penetración de radiación ultravioleta en la piel

Las personas que trabajan en ambientes cubiertos; reciben el 3% de la radiación ambiental en cambio los que lo hacen al aire libre reciben un 25%. (10 veces más). Los efectos adversos causados por sobre exposición solar en cualquier individuo sano, se pueden separar en aquellos que se observan a corto plazo: eritema solar reacción de pigmentación y alteraciones inmunológicas; y aquellos que sólo se manifiestan después de muchos años de exposiciones solares exageradas y reiteradas: fotoenvejecimiento y fotocarcinogénesis. La figura 6 muestra las enfermedades originadas por la radiación ultravioleta.¹⁸

INFLAMACIÓN:¹⁸

La exposición a la luz UV origina inflamación la cual puede ser aguda por exposición brusca en una piel no adaptada o bien por exposiciones repetidas se provoca una inflamación crónica. La radiación ultravioleta estimula la inflamación por 3 mecanismos:

- Induce liberación de óxido nítrico.
- Estimula la liberación de neuropéptidos.
- Estimula la proliferación y queratinización

ALTERACIONES INMUNOLÓGICAS ^{19,20}

La exposición de la piel a UV-B causa una disminución de la respuesta inmune celular en el sitio irradiado. Sin embargo si se incrementan las dosis, es también posible observar alteraciones sistémicas.

Experimentalmente se alteran 2 tipos de respuestas inmunológicas:

- La respuesta de hipersensibilidad retardada, por alteración de la presentación de antígenos por las células de Langerhans.
- La respuesta de rechazo de tumores malignos antigénicos inducidos por luz UV.

La UVA I inhibe el número y la migración de las células de Langerhans, provoca tolerancia de los linfocitos T "helper" (CD4+), inhibe la producción de interferón (y disminuye la producción de moléculas de adhesión (ICAM-1) por el queratinocito, entre otros cambios.

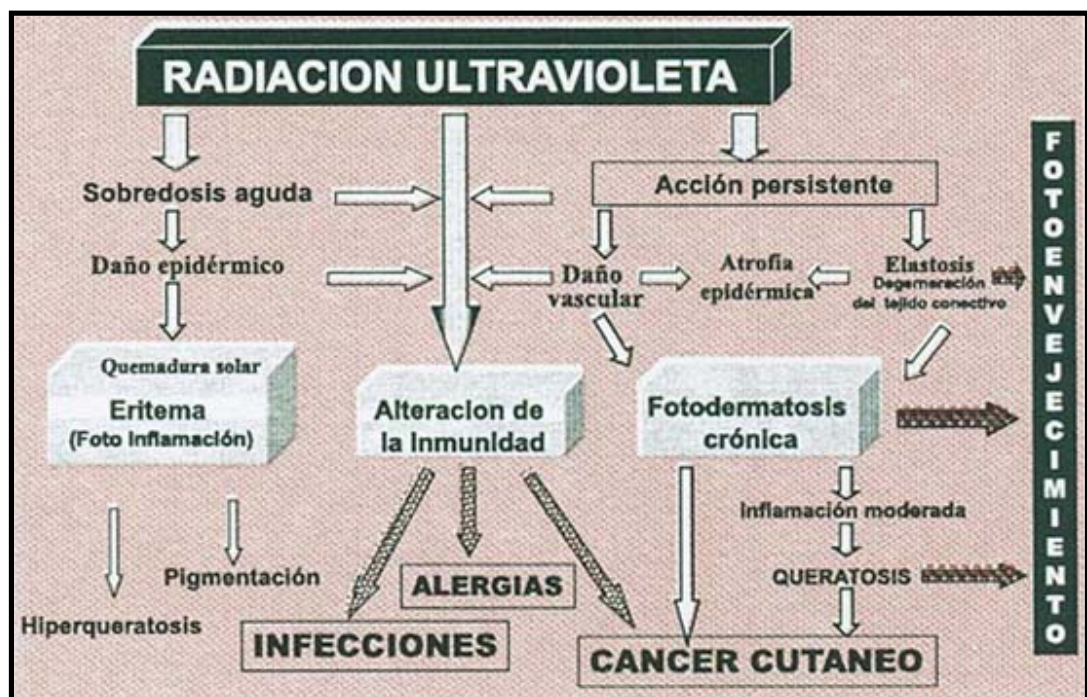


Figura Nº 7: Fotoenvejecimiento

FOTOENVEJECIMIENTO (Heliodermia) ^{21,22}

Este término comprende los cambios clínicos y microscópicos de la piel foto expuesta crónicamente. Tiene fenómenos propios, clínicos e histológicos que permiten diferenciarlo del envejecimiento fisiológico. Clínicamente se encuentran arrugas superficiales y profundas, surcos, piel engrosada, manchas pigmentarias, coloración amarillenta o cetrina, laxitud, telangiectasias.

Histológicamente, el sello del fotoenvejecimiento está dado por la elastosis de la dermis debido a un proceso degenerativo de la fibra elástica propio del daño por luz UV.

FOTOCARCINOGENESIS ²³

La fotocarcinogénesis está relacionada con un efecto acumulativo dosis dependiente de luz UV y el tipo de piel. Entre las evidencias que apoyan que la radiación solar es un factor causal del cáncer de piel destacan:

- Asociación en blancos, del cáncer de piel con las áreas fotoexpuestas.
- Asociación inversa con la protección contra la UV. El cáncer de piel es poco frecuente en las razas de piel oscura.
- Asociación con la cantidad de exposición solar.
- Asociación con la intensidad de la exposición solar.
- Experimentalmente, con la luz UV se ha demostrado una clara dosis respuesta en el desarrollo de acantosis, papilomatosis y eventualmente cáncer invasor.

- Evidencia clínica: Enfermedades genéticas con fotosensibilidad como Albinismo y Xeroderma pigmentoso se asocian a desarrollo precoz de cáncer de piel.

La fotocarcinogénesis provocada por una exposición solar excesiva persiste por 10 -20 años (efectos acumulativos). La UVB y UVA corta (320-340) provocan mutaciones del ADN a lo cual se asocia a un defecto de la inmunidad y alteración de los mecanismos de reparación de la piel. La Figura 7 resume los principales factores en la fotocarcinogénesis.

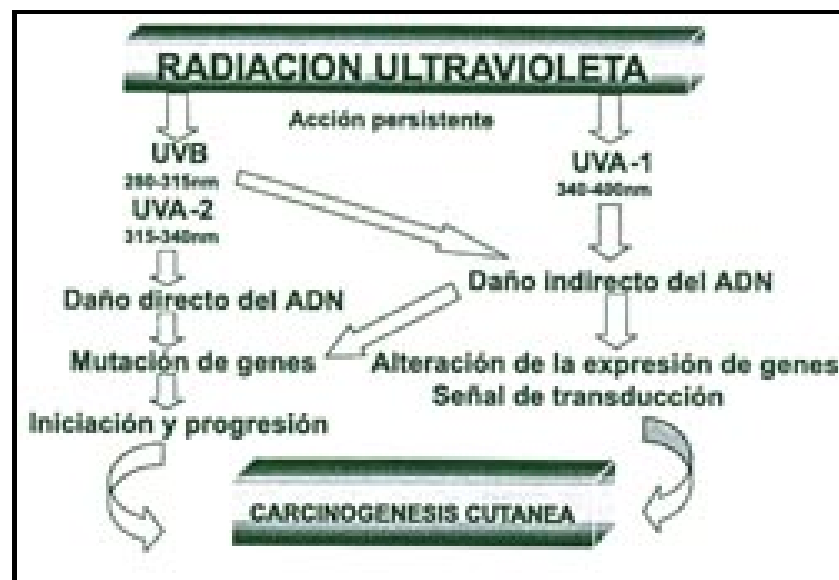


Fig. 8: Fotocarcinogénesis.

Otro factor de riesgo de carcinogénesis es la disminución de la densidad de la capa de ozono que filtra la radiación UV que se atribuye a la presencia de fluorocarbonos en la atmósfera.

La luz UV también participa en la generación de melanomas. Las quemaduras por irradiación brusca, especialmente en niños o adolescentes y en zonas habitualmente cubiertas son factores inductores de importancia.

1.3.4. Eritema solar.

El daño producido por la radiación UV: Eritema solar, se entiende como el proceso inflamatorio agudo producido por sobre exposición al sol. La quemadura solar alcanza su máximo a las 24 horas.

Los signos y síntomas cutáneos son:

- ❖ Enrojecimiento de la piel
- ❖ Edema
- ❖ Vesiculación
- ❖ Dolor
- ❖ Formación de ampollas
- ❖ Necrosis, costras
- ❖ Pigmentación desigual

Las alteraciones microscópicas son:

A nivel epidérmico:

- ❖ Edema intracelular
- ❖ Vacuolización e hinchamiento de los melanocitos
- ❖ Queratinocitos disquertósicos
- ❖ Migración de células Langerhans

A nivel dérmico:

- ❖ Edema intersticial
- ❖ Hinchamiento de las células endoteliales
- ❖ Edema perivascular
- ❖ Degranulación y pérdida de mastocitos
- ❖ Infiltración de polimorfosnucleados y monolitos.

De todos estos signos se determinará si existe o no un eritema causado por el sol. ¹⁷

En los últimos años, numerosos estudios han incidido en el posible uso de antioxidantes biológicos, adecuadamente formulados, para su aplicación tópica con fines protectores o reparadores.

Miller et al. 1 , hace mas de 10 años, demostraron que la agresión del UV a la piel humana incrementaba de forma evidente la síntesis de PGE2, utilizando para ello una vía metabólica que dependía de la actividad tirosina cinasa.

Diversos autores, como Buckman et al. comprobaron que la piel humana expuesta a la radiación UV estimulaba la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COOX-2), y que esta enzima era responsable de la síntesis de la PGE2. Posteriormente, Chang et al responsabilizaron a la radiación UV de la expresión de la sintasa no inducible en la epidermis humana expuesta.

Las investigaciones de Notoya et al. han dado lugar a considerar que tanto PGE2 como NO actúan como segundos mensajeros de la agresión UV al epitelio cutáneo humano, y son los principales

responsables de que se desencadene un proceso inflamatorio implicado en la respuesta eritematogena de la piel.

Es evidente que tanto el eritema como la mayoría de los daños solares que causa la radiación UV en la piel humana son consecuencia de una verdadera cascada de procesos oxidativos, en la medida que superan el potencial antioxidante que posee el tejido cutáneo en la zona afectada por la agresión. Por tanto, numerosos estudios han investigado el posible uso de antioxidantes biológicos, adecuadamente formulados, para su aplicación tópica con fines protectores o reparadores.²⁴

1.4. Productos cosméticos “after sun” o post eritema solar

Actualmente, la fitocosmética ofrece una gama amplia de cosméticos, tanto filtros solares como productos para después del sol, eficaz para la fotoprotección. Los productos para después del sol se pueden formular utilizando exclusivamente ingredientes vegetales; sin embargo, en el caso de los filtros solares, los extractos vegetales se deben combinar con otros filtros solares de síntesis para ofrecer un producto realmente eficaz en la protección solar.²⁵

Dentro de los productos considerados para después del sol, tenemos:

- ❖ Antiinflamatorios.
- ❖ Anestésicos.
- ❖ Sustancias refrescantes.
- ❖ Excipiente hidratante.

- ❖ Cicatrizantes.

Dentro de los productos antiinflamatorios, tenemos:

- ❖ Azuleno y bisabolol.
- ❖ Ácido glicirretínico
- ❖ Los beta carotenos.
- ❖ Alantoína.
- ❖ Los extractos vegetales que contengan flavonoides.
- ❖ Los geles de aloe.
- ❖ Los aceites emulgentes.
- ❖ El biolisado de Hafnia.

De estos tipos de productos, estudiaremos los flavonoides.¹⁵

Los pigmentos flavonoides son los metabolitos secundarios más difundidos, son encontrados en todas las plantas vasculares pero algunas clases están más difundidas que otras; mientras las flavonas, flavonoles y flavononas se encuentran en muchas partes de las plantas las isoflavonas, chalconas y auronas tienen una presencia más limitada.

1.5. Técnicas utilizadas en el aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios.⁶

1.5.1. Cromatografía

El principio básico de la cromatografía consiste en una distribución desigual entre dos fases: estacionaria y móvil, de un determinado compuesto. Esto permite separar una mezcla en sus componentes de

acuerdo a sus diferentes distribuciones en un sistema de dos fases dado.

- **Cromatografía en capa fina.**

Es una variante de la cromatografía en columna o en papel; la fase fija está formada por una capa uniforme de adsorbente (cromatografía de adsorción) y que sirve de soporte de la fase estacionaria (cromatografía de partición).

Los adsorbentes comerciales tienen aditivos (generalmente yeso) para aumentar la fuerza de adhesión al vidrio y estabilizar así el estrato para UV: fluoresceína de sodio, que florece cuando se expone a la luz de 254 nm y los compuestos adsorbidos aparecen como manchas oscuras sobre fondo verde, y el ácido sulfónico del hidroxipireno, que florece a 366 nm y los compuestos se visualizan como manchas oscuras sobre fondo azul.

Hay una gran variedad de adsorbentes comerciales; los más frecuentes son silicagel, alúmina, celulosa, celita (tierra de diatomeas), poliamida, silicato de magnesio. El adsorbente más común es la silicagel con granulometría de 20 a 100 amstrongs (para columna se prefiere de 60 o de 30 amstrongs para componentes no polares)

Los métodos de elución son:

- **Ascendente**, que es muy lenta.
- **Descendente**, es más rápida.
- **Circular**, muy lenta pero nítida.
- **Bidimensional** especial para mezclas muy complejas, puede

emplearse en sentido ascendente o en el descendente.

- **Elución continua**, puede ser usada con los cuatro anteriores, se le conoce también como sobre elución.

- **Elusión múltiple**, una vez desarrollado el cromatograma hasta el final de la fase estacionaria, éste es secado en la cámara y secado antes de introducirlo de nuevo en el solvente de elusión que puede ser o no el mismo.

- **Cromatografía de columna.**

- Cromatografía de adsorción

- La distribución tiene lugar entre un adsorbente sólido (fase estacionaria) y un eluyente líquido (fase móvil).

- Los adsorbentes deben tener alta capacidad de adsorción, ser insolubles en el eluyente e inerte en las sustancias a ser separadas por cromatografía. Entre los tipos frecuentes de adsorbentes se tiene:

- **Silicagel**, para la mayoría de las sustancias, se emplea generalmente en proporción 1 :40 (peso de muestra a peso de silicagel)

- **Alúmina**, para compuestos menos polares, mayor poder de adsorción y permite separar a veces isómeros (proporción 1:20).

- Silicato de magnesio (Florisil), adsorbancia intermedia, para separar lípidos, glicósidos y azúcares.

- **Carbón**, generalmente se usa mezclado en una relación 1:1 con celita y separa azúcares, polihidroxiaromáticos y poliaromáticos.

CAPÍTULO II

CAPÍTULO II

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

2.1. Materiales.

2.1.1. Material botánico.

Se encuentra conformado por las flores de la especie *Iresinee weberbaueri* (Flor blanca).

- **Recolección y selección de la muestra.**

La especie *Iresinee weberbaueri* “Flor blanca”, fue recolectada en La oscurana, Caserío el Nogal, pueblo de Bolívar, distrito de Bolívar, provincia de San Miguel de Pallaques, departamento de Cajamarca, en el mes de enero del 2008.

Se seleccionaron las flores intactas e íntegras; eliminando lo deteriorado y/o con hongos.

- **Secado y conservación.**

Las flores de *Iresinee weberbaueri* (Flor blanca) fueron secadas bajo sombra y estabilizadas a una temperatura no mayor de 40°C. Posteriormente, con la ayuda de un molino manual se molió la muestra, almacenando el material obtenido en frascos de vidrio ámbar.

2.1.2. Material biológico.

Ratones albinos, machos, de aproximadamente 25 a 30 g de peso, correctamente alimentados.

Los animales fueron adquiridos del cepario del Instituto Nacional de Salud – Chorrillos. Los cuales tuvieron ciclo de oscuridad de 12 horas antes de los ensayos. El alimento y el agua fueron dotados a libertad.

2.1.3. Material de laboratorio y reactivos.

- 01 matraz de 200 ml Pirex.
- 01 probeta de 10 ml, 50 ml y 100 ml Pirex.
- 01 kitasato de 500 ml Pirex.
- 01 pipeta de 1 ml, 5 ml y 10 ml
- Baguetas simples.
- Embudos Pirex.
- 01 vaso precipitado de 150 ml Pirex.
- 01 vaso precipitado de 250 ml Pirex.
- Aspersador.
- Cuba para Cromatografía en Capa Delgada.
- Recipientes de diferentes capacidades.
- Soportes.
- Kit de disección.
- Frascos para muestras biológicas.

REACTIVOS

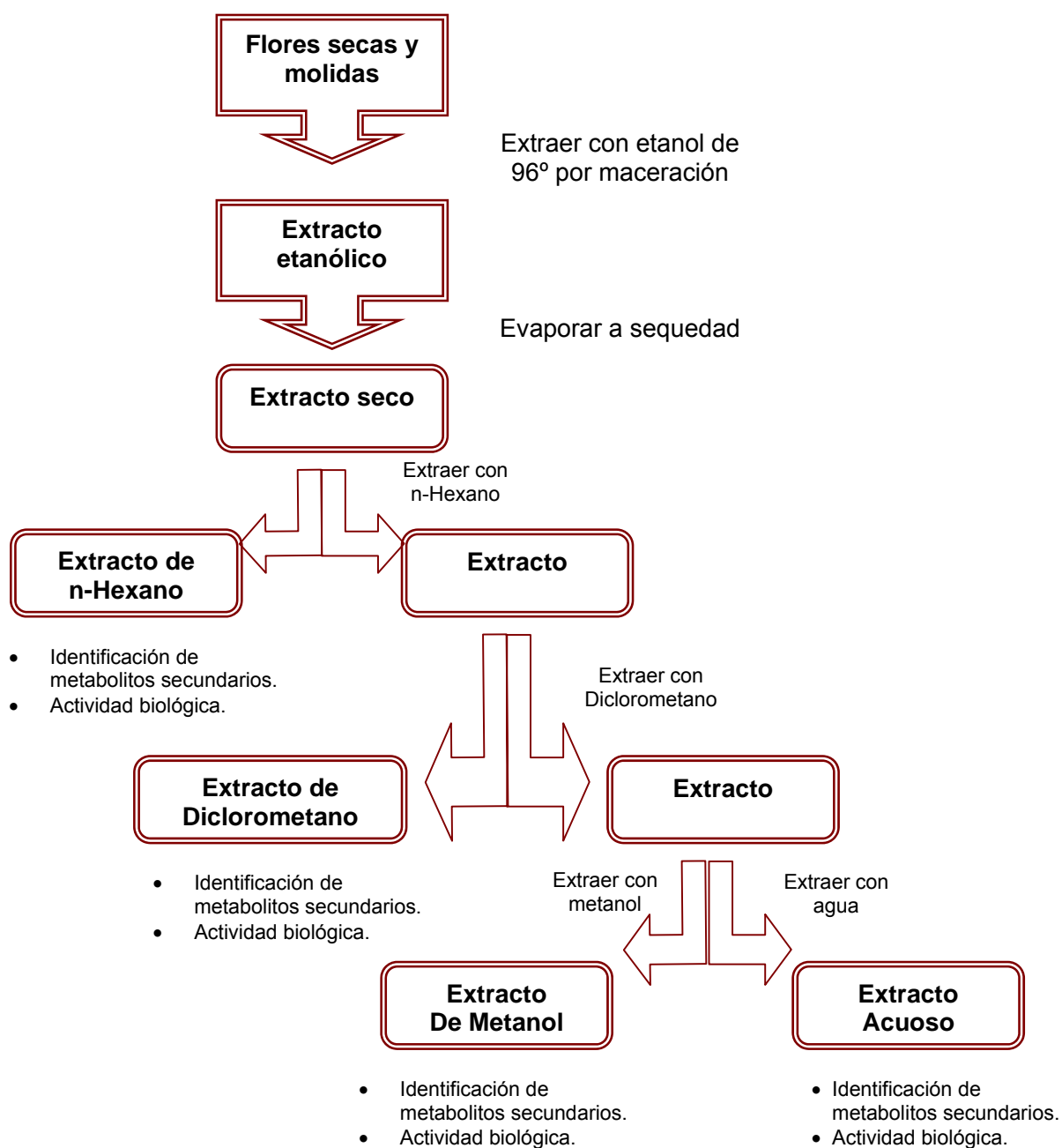
- Para realizar la marcha fitoquímica.
- Silicagel para Cromatografía en columna.
- Polisorbato 80.
- Formol al 10%
- Diclorometano
- N-Hexano
- Metanol

2.2. Estudio fitoquímico.

2.2.1. Obtención de extractos.

La obtención de los extractos se realizó en base al:

Fluxograma N°1 : Obtención de extractos de diferente polaridad de la parte de flores de *Iresinee weberbaueri* “Flor blanca”



2.2.2. Screening fitoquímico del extracto etanólico.

Nos permitirá determinar los metabolitos secundarios presentes en la planta mediante reacciones de coloración y precipitación.

2.2.3. Identificación de metabolitos secundarios.

Se realizará por reacciones de coloración y/o precipitación, teniéndose en cuenta las siguientes reacciones en las fracciones obtenidas:

Detección : Taninos

Reacción : Gelatina- sal

Se preparan tres soluciones: A una solución de 1g de gelatina en 100 ml de agua se le agrega 10g de NaCl. La precipitación con éste reactivo es indicativo de la presencia de taninos.

Detección : Flavonoides.

Reacción : Shinoda.

A una solución alcohólica del extracto se agrega limaduras de magnesio seguidas por gotas de HCl concentrado. Las coloraciones rojas indican que es positiva.

Detección : Aminoácidos.

Reacción : Ninhidrina.

Una alícuota del extracto se mezcla con 2 ml de la solución al 0.25% de ninhidrina, se calienta por 5 a 10 minutos en baño de agua, la reacción se considera positiva cuando se desarrolla un color azul

violáceo.

Detección : Quinonas.

Reacción : Borntrager.

Al extracto se le agrega gotas de bencina el cual se agita con solución acuosa de NaOH al 5%. La producción de una coloración rosada a roja en la etapa acuosa es indicativo de antraquinonas y naftoquinonas.

Detección : Alcaloides.

Reacción : Mayer, Dragendorf.

Reacción de Mayer: se prepara mezclando 1.36 g de HgCl_2 en 60 ml de agua con 5 g de KI en 10 ml de agua. Se acidifica el extracto con 1 ml de HCl al 1 %, se añade 2 o 3 gotas del reactivo, la aparición de un precipitado blanco o crema indicará que la reacción es positiva.

Detección : Glicósidos.

Reacción : Molish

Reacción: se agrega a la muestra etanólica 3 gotas de α -naftol y 05 gotas de ácido sulfúrico.

Detección : Compuestos fenólicos.

Reacción : Cloruro férrico.

Al extracto se le agrega gotas de cloruro férrico. La producción de una coloración verdosa es indicativo de compuestos fenólicos.

2.2.4. Identificación de metabolitos secundarios del extracto de diclorometano de la parte de flores de *Iresinee weberbaueri*

Las fracciones obtenidas fueron cromatografiadas sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, de 0.25 mm de espesor. Los solventes usados como fase móvil en la cromatografía de capa fina fueron n-hexano y acetato de etilo.



Figura Nº 9: Cromatografía de columna del extracto

Se realizó cromatografía en capa fina de las 03 fracciones obtenidas con actividad biológica positiva, determinándose que en la fracción “Diclorometano” se encontraban los productos mayoritarios.

A las fracciones obtenidas se les realizaron pruebas de identificación de los metabolitos secundarios utilizando reacciones químicas de precipitación y coloración.

Se realizaron los ensayos farmacológicos correspondientes a dicho extracto.

2.2.5. Bioensayo para evaluar el efecto regenerador solar de los extractos de *Iresinee weberbaueri* Suess.²⁶

- **Fundamento**

Debido a que la regeneración dérmica puede ser influido por diversos factores, entre ellos, la administración de sustancias químicas (como formulaciones dérmicas) que coadyuvan al efecto de regeneración; el fundamento de este método está basado en el empleo de extractos de *Iresinee weberbaueri* como agentes coadyuvantes del efecto de regeneración dérmica por daño solar.

Por lo tanto se debe determinar el efecto regenerador de la piel por daño solar, de manera comparativa entre los extractos de diferente polaridad de *Iresinee weberbaueri*, sobre ratones.

- **Determinación preliminar de la dosis efectiva regeneradora del Extracto etanólico (Total)**¹⁹

Para determinar la dosis del extracto para los animales de experimentación, teniendo en cuenta como único dato el consumo popular, en el cual no existe una dosis establecida para uso tópico.

Se realizó un ensayo preliminar con dos Grupos, de 4 ratones machos cada uno, con los extractos a experimentar en la concentración de 5, 10 y 15% en propilenglicol; observándose que la concentración de 15% fue la más adecuada.

El extracto acuoso, etanólico y metanólico fue disuelto en propilenglicol. Para el extracto de n-Hexano se utilizó un vehículo de Polisorbato 80 al 5%.

Todos los extractos fueron administrados por vía tópica a los animales de experimentación; la dosis administrada fue de 15% del extracto correspondiente, el volumen de administración fue de 0.5 ml. Cada grupo tuvo un grupo control de propilenglicol y vehículo de polisorbato 80 al 5% (en suero fisiológico). Los extractos fueron administrados durante los 6 primeros días de duración del estudio.

2.2.6. Bioensayo para evaluar el efecto regenerador solar de la formulación en gel de los extractos de *Iresinee weberbaueri*.

Para los ensayos en formulación fue usada la misma concentración de 15% en una base de gel, según:

Tabla Nº 01: Tabla de fórmula para gel.

INSUMOS	PORCENTAJE
Agua desionizada	79%
Extracto	15%
Regulador de pH	5%
Carbopol	1%
Preservante 1	0,1%
Preservante 2	0,1%

Se trabajó con un grupo control usando la base del gel (es decir exceptuando el extracto de la fórmula)

○ **Animales de experimentación.**

Se utilizaron ratones albinos, todos machos de 10 semanas de edad, con un peso entre 24 – 28 gramos, las cuales fueron organizadas en cinco grupos de trabajo:

Grupo I (Control)	:	Animales sometidos a la dosis UVC sin aplicarse producto alguno.
Grupo II (Blanco)	:	Animales solamente depilados.
Grupo III	:	Animales sometidos a la dosis UVC aplicándoles tópicamente en el lomo el vehículo.
Grupo IV	:	Animales sometidos a la dosis UVC aplicándoles tópicamente en el lomo el gel con extracto.
Grupo V	:	Animales sometidos a la dosis UVC aplicándoles tópicamente en el lomo un gel comercial.

Todos los animales fueron identificados con diferentes colores y números; estando constituido cada grupo de trabajo y control por 5 ratones machos.

○ **Descripción de la técnica.**

Los animales de experimentación se separaron en jaulas de acero inoxidable, independientes, con libre acceso al bebedero de agua.

Sesenta y dos horas antes de iniciar el ensayo, se les depiló el lomo con una crema depiladora comercial “Depilé” (para pieles y zonas sensibles).

Para la fuente lumínica se utilizó la lámpara Sylvania con un potencial útil de emisión en UV de 8,3 W en la que corresponde al 95% de la intensidad luminosa a la línea de resonancia del mercurio en 253,7 nm (radiaciones UVC).

La radiación estimada recibida por los ratones fue de 1,3 mW/cm² para una dosis única.

Para todos los experimentos se utilizó un número de 5 animales por grupo, los que se dispusieron en las jaulas con libre movimiento todo el tiempo que permanecieron expuestos a la RUV, el cual fue de 30 minutos manteniendo una distancia de 30 cm entre la lámpara y los animales.

Para cada ensayo se realizaron dos repeticiones en ocasiones distintas. De cada repetición se tomó un ratón al azar para su análisis histológico.

La distribución por grupos se realizó según lo mencionado en el ítem anterior (animales de experimentación).

Observaciones:

Los animales se observaron minuciosamente en 7 momentos: inmediatamente después de transcurrir el tiempo de exposición a la lámpara, luego, al 1º, 2º, 3º, 4º, 5º y 7º día, durante el transcurso tarde.



Figura Nº 10: Aplicación tópica del gel en los lomos de los ratones

○ **Interpretación de los resultados**

Los resultados a los tiempos inmediatamente después de la exposición, 1º día, 2º día, 3º día, 4º día, 5º día y 6º día, fueron observacionales según los signos dérmicos encontrados.

Para el 7º día, se tomaron muestras de la piel mediante cortes histológicos los cuales fueron conservados en formol al 10%, y posteriormente llevados a un Patólogo, donde las muestras fueron fijadas en formol neutro, procesadas histológicamente, cortadas a 3 micras y coloreadas con H-E (Hematoxilina- Eosina)

y observadas con microscopía óptica para su lectura e interpretación correspondientes.

2.2.7. Análisis para determinar las propiedades físico químicas de la formulación en gel de los extractos de *Iresinee weberbaueri* Suess.

- **Determinación de la viscosidad**(Según técnica propia de laboratorio):

El modelo de viscosímetro a usar fue:

Viscosímetro Digital Marca Brookfield Modelo RVDVE

El viscosímetro se encontraba previamente calibrado y se verificó la burbuja indicadora de desnivel, la misma que estuvo centrada.

Determinar la viscosidad de acuerdo a la especificación:

Viscosidad Directa: la muestra se encontraba a la temperatura indicada en la especificación técnica, en este caso a 25°C. Se utilizó la aguja indicada y la velocidad en el equipo. La cantidad de muestra fue de 250 gramos. Se colocó la aguja en el equipo sujetando hacia arriba la rosca, se sumerge la aguja en la muestra y luego se baja el equipo hasta que la aguja este a nivel con la muestra, colocar en movimiento al equipo y esperar el tiempo indicado en la especificación (1 minuto). Para controlar el tiempo se utilizó un cronómetro con alarma. Una vez finalizado el

tiempo parar el equipo y registrar el resultado en cP y/o porcentaje de torque. La lectura en cP con el viscosímetro RVDVE es directa.

- **Determinación del pH (Según técnica propia de laboratorio)**

El equipo a usar fue pH metro de mesa marca Hanna Instruments

Para ello el pH metro descrito se encontraba previamente calibrado con las soluciones buffers correspondientes.

Determinar el pH de acuerdo a la especificación:

- pH Directo: la muestra debe estar a la temperatura indicada en la especificación técnica, en este caso a 25° C. Se sumerge el electrodo directamente dentro de la muestra, esperar hasta que la lectura se estabilice. Registrar el resultado.

- **Determinación del residuo seco del extracto (Según técnica propia de laboratorio)**

Para este ensayo no se pudo realizar a los extractos obtenidos, ya que estaban constituidos de solventes muy volátiles y con propiedades no seguras para ingresarlos a la estufa a 105°C.

2.2.8. Análisis para determinar las propiedades microbiológicas de la formulación en gel de los extractos de *Iresinee weberbaueri* Suess.

- **Recuento total de microorganismos aerobios y Recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras (Según USP)**

Diluciones de la Muestra:

Pesar 10 g de muestra en un contenedor 90 mL de solución buffer fosfato 7.2 estéril. Obteniendo una dilución 1:10. Agitar magnéticamente durante 5 minutos.

Siembra de la muestra:

Se deben realizar un blanco para el análisis microbiológico, tanto para TSA (Trypticase soya agar), como para SDA (Sabouraud dextrosa agar).

De la dilución pipetear aseptícamente 1 mL de la muestra diluida que ha sido mezclada, a dos placas petri. Identificar las placas con número de muestra, fecha y siglas del agar.

Recuento Total de microorganismos aerobios: adicionar 15 a 20 mL de Agar Trypticase soya a 43-46° C a la placa petri inoculada y darle movimientos giratorios para obtener una mezcla completa. Después que el agar solidifique invertir las placas e incubar a 35° C. Revisar después de 48 horas, expresar el resultado como promedio de ufc por g o mL de muestra analizada. Registrar los resultados.

Recuento Total combinado de Hongos filamentosos y

Levaduras: adicionar 15 a 20 mL de Agar Sabouraud Dextrosa a la placa petri inoculada y darle movimientos giratorios para obtener una mezcla completa. Después que el agar solidifique e incubar a 20-25° C. Revisar después de 7 días y registrar los resultados.

○ **Determinación de la presencia de patógenos: (Según USP)**

Diluciones de la Muestra:

Pesar 05 g de muestra en un contenedor 45 mL de caldo, según corresponda.

Colocar en la incubadora a 32.5°C de 24 a 48 horas.

Siembra de la muestra:

Una vez sanitizado el área de trabajo, se esteriliza el asa de kholle con la ayuda de la llama del mechero.

En la dilución obtenida en cada caldo ingresar el asa de kholle para la recolección de muestra.

Proceder a estriar la muestra recolectada sobre el agar correspondiente, según la siguiente tabla:

Tabla Nº 02: Tabla resumen de la evaluación microbiológica.

Caldo	Agar	Patógeno	Característica de las colonias
Caldo lactosado (LB)	Agar de azul de metileno	<i>Escherichia coli</i>	Colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado.
	Levine eosina		
Caldo Triptica Soya (TSB)	Agar Cetrimide	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Colonias verde fosforescente.
	Agar Vogel Johnson	<i>Staphylococcus aureus</i>	Colonias pequeñas, negras rodeadas de una zona amarilla-

Se coloca en la incubadora a 32.5°C +/- 2.5°C de 24 a 48 horas.

2.2.9. Análisis estadísticos de los datos.

Se consideran variables cualitativas, indicando las características observacionales de las expresiones clínicas en la piel de los ratones. Cada característica corresponde a una categoría y será medida bajo la clasificación de dichos atributos. Las variables cualitativas serán de tipo ordinal, ya que estarán identificadas por una escala establecida.

CAPÍTULO III

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Del estudio fitoquímico.

Tabla Nº 03: Marcha del extracto etanólico de las flores de *Iresine weberbaueri* Suess.

REACCIÓN	METABOLITO	RESULTADOS
Gelatina-Sal	Taninos	+
Shinoda	Flavonoides	+
Ninhidrina	Aminoácidos	--
Borntrager	Quinonas	--
Mayer	Alcaloides	+
Dragendorf	Alcaloides	++
Glicósidos	Glicósidos	+
Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	++

3.2. Del estudio biológico

TABLA Nº 04.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES A TRAVÉS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA

Días Control	0							
Grupos de evaluación	(luego de UVC)	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Control	Ligero eritema	Lesiones Costro descamativas	Lesiones Costro descamativas	Lesiones Costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Blanco	Piel normal	Piel Normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal
Propilen glicol	Ligero Eritema	Eritema Intenso	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones dérmicas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Metanol	Ligero Eritema	Eritema intenso	Ligero eritema	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones dérmicas	Inicio remisión lesiones
Agua	Ligero Eritema	Ligero eritema	Ligero eritema	Ligero eritema	Eritema Apenas perceptible	Inicio remisión lesiones	Inicio remisión lesiones	Remisión
Extracto Total	Ligero Eritema	Ligero eritema	Eritema dérmico	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Inicio remisión lesiones	Inicio remisión lesiones
N- hexano	Ligero Eritema	Eritema intenso	Eritema dérmico	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Dicloro metano	Ligero Eritema	Ligero Eritema	Eritema Apenas perceptible	Eritema Apenas perceptible	Inicio Remisión lesiones	Inicio Remisión lesiones	Remisión	Remisión

Fuente : Datos obtenidos del trabajo experimental.

TABLA Nº 05.- TABLA DE VALORES NUMÉRICOS SEGÚN LA EVALUACIÓN CLÍNICA POR LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES

EVALUACION CLINICA	PUNTAJE
Piel normal	0
Eritema apenas perceptible	2
Ligero eritema	3
Eritema dérmico	4
Eritema intenso	5
Lesiones dérmicas	6
Lesiones cóstricas	7
Lesiones costro descamativas	8
Inicio de remisión de lesiones	1.5
Remisión	1

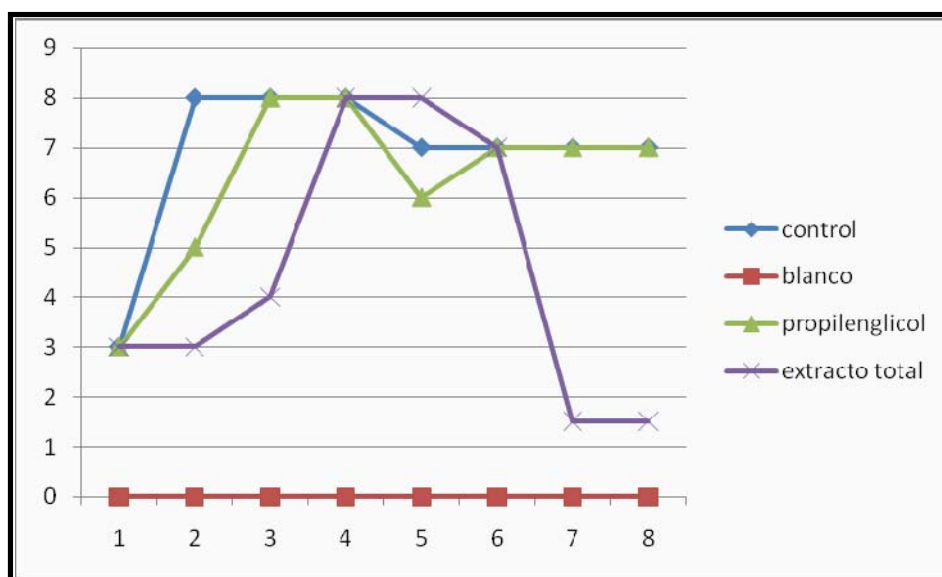


GRÁFICO Nº 01.- COMPORTAMIENTO DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO (TOTAL) OBTENIDO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

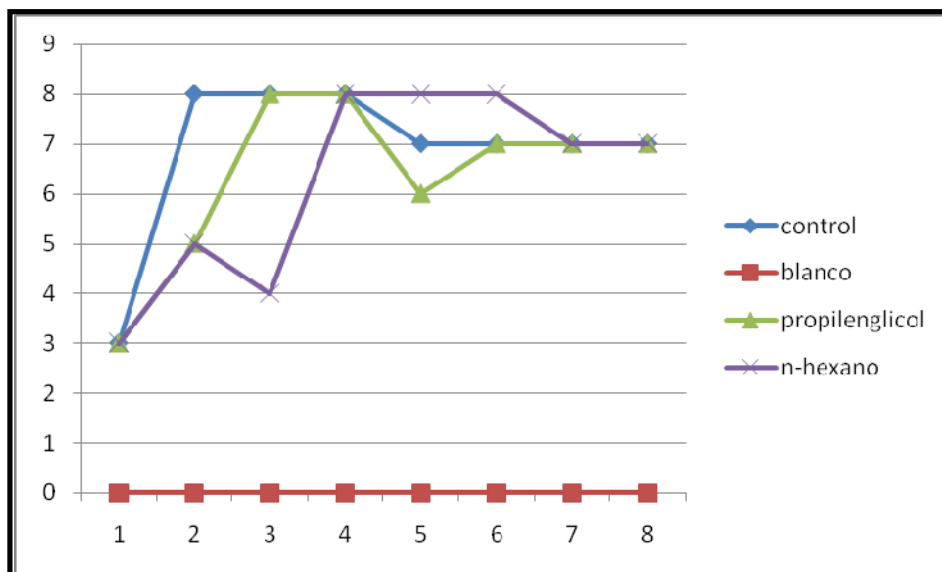


GRÁFICO Nº 02.- COMPORTAMIENTO DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE N-HEXANO OBTENIDO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

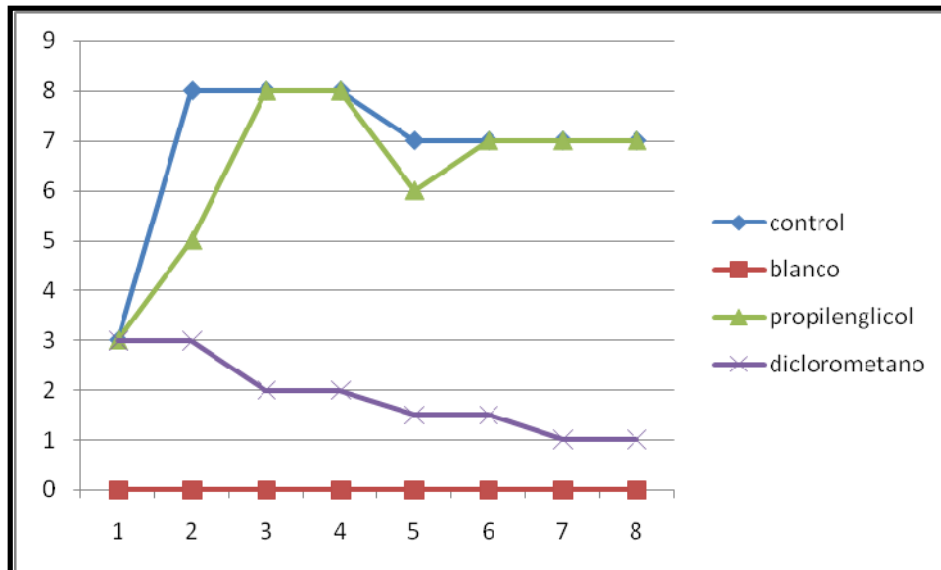


GRÁFICO Nº 03.- COMPORTAMIENTO DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO OBTENIDO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

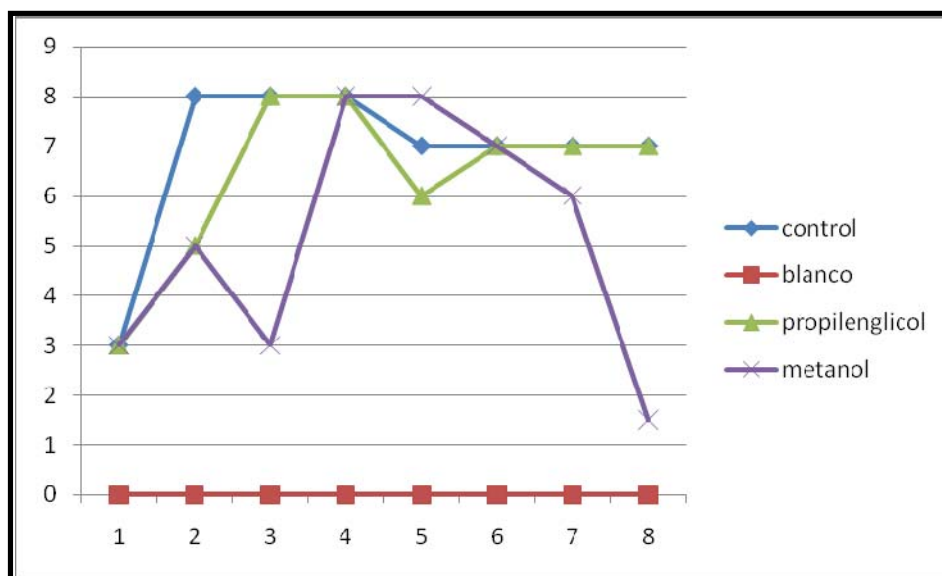


GRÁFICO Nº 04.- COMPORTAMIENTO DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO DE METANOL OBTENIDO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

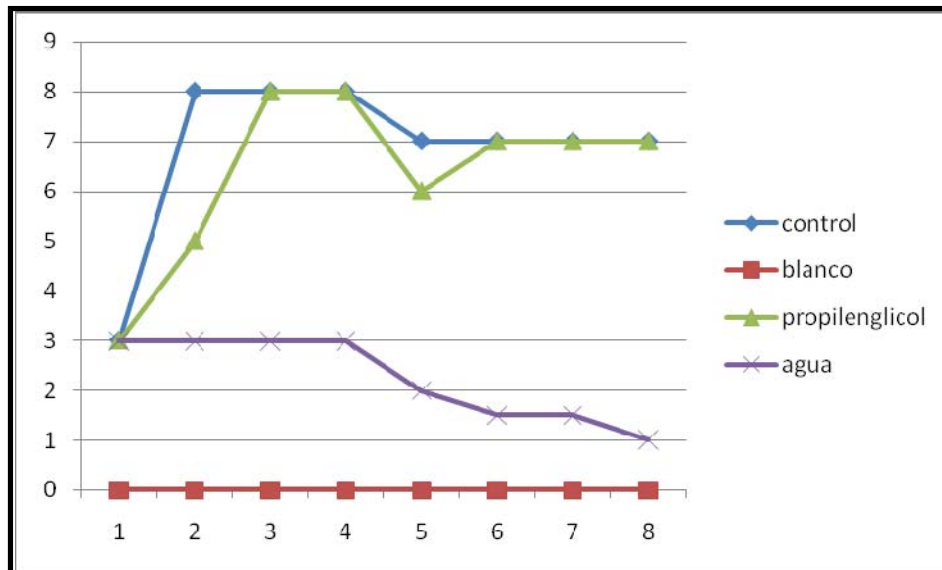


GRÁFICO Nº 05.- COMPORTAMIENTO DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA DE LA ADMINISTRACIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO OBTENIDO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

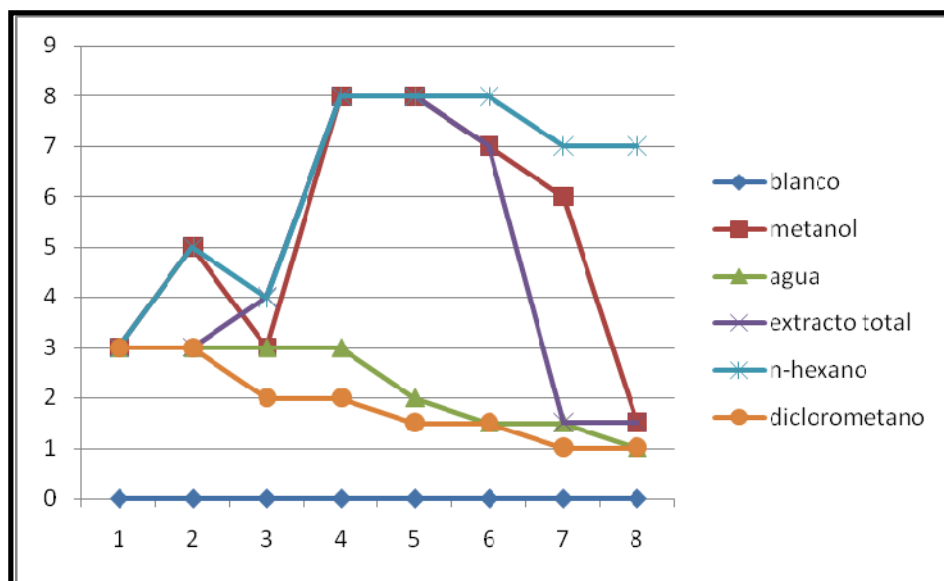


GRÁFICO N° 06.- COMPARACIÓN DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA ENTRE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

TABLA N° 06.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

Grupo de evaluación	Análisis histológico
Blanco (B)	Preparado histológico sin alteraciones microscópicas significativas.
Propilenglicol (T)	Al examen microscópico se observa epidermis con reacción acantósica e hiperplasia papilar moderada focal, asociado a hiperqueratosis moderada. En dermis superficial se observa proliferación vascular con leve infiltrado linfocítico circundante.

N- Hexano (D´)	Epidermis con patrón de reacción acantósico, con hiperplasia papilar e hiperqueratosis severa. Queratinocitos apoptóticos en membrana basal. Infiltrado inflamatorio crónico leve.
Diclorometano (A´)	Foco de reacción acantósica e hiperqueratosis leve. Dermis superficial y profunda: sin alteraciones microscópicas significativas.
Metanol (M)	Epidermis con patrón de reacción acantósico e hiperqueratosis leve. En dermis superficial: infiltrado inflamatorio crónico perivascular.
Agua (A)	Epidermis con reacción acantósico e hiperqueratosis leve. Dermis sin alteraciones microscópicas significativas.
Extracto total (E)	Epidermis con patrón de reacción focalmente severo, con proyecciones “cupuliformes”, asociado a moderada hiperqueratosis. Dermis papilar: con moderado infiltrado inflamatorio linfocítico, a predominio perivascular.

Fuente : Informe de análisis histológico – Anatomía patológica

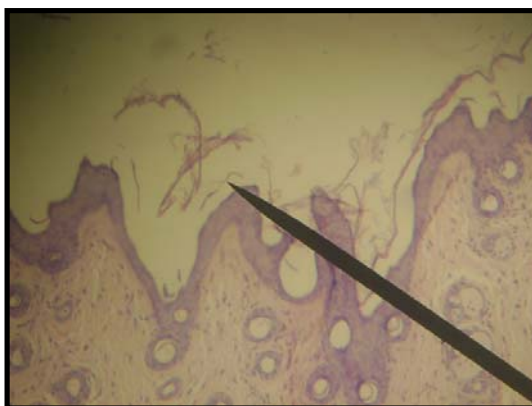


GRÁFICO N°07: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO

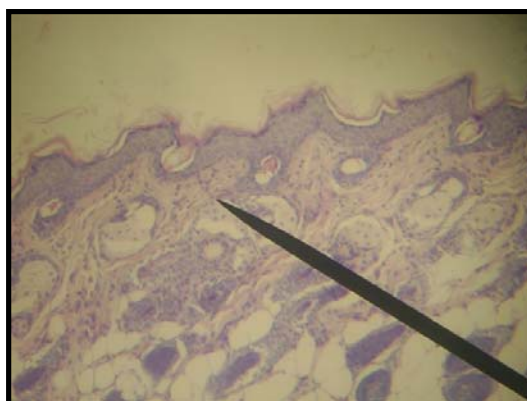


GRÁFICO N°08: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL EXTRACTO METANÓLICO

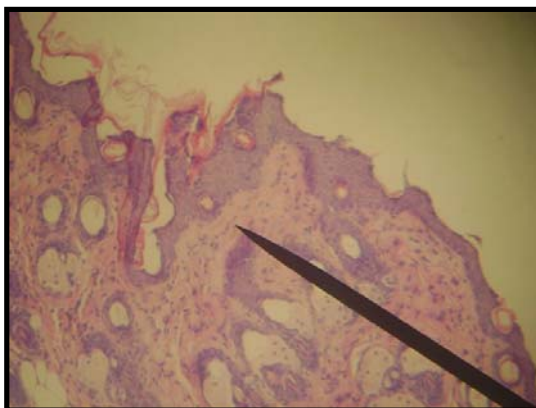


GRÁFICO Nº09: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL VEHÍCULO: PROPILENGLICOL

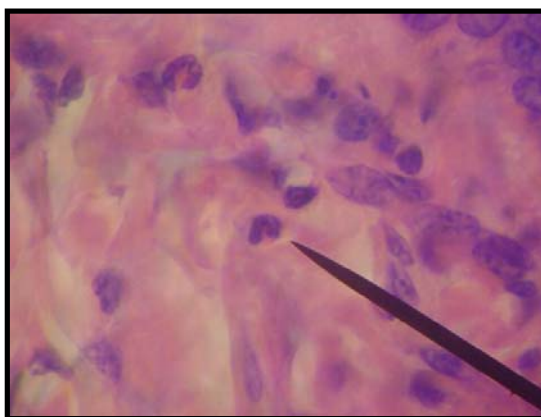


GRÁFICO Nº10: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE N-HEXANO

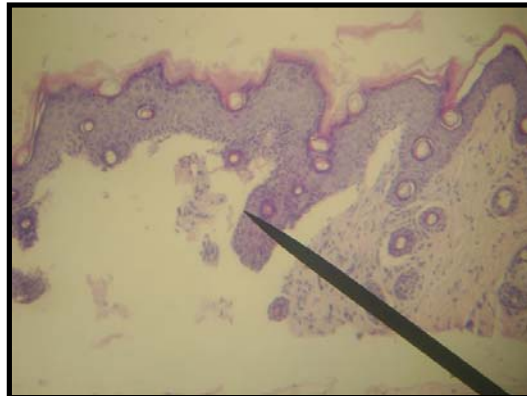


GRÁFICO Nº11: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO

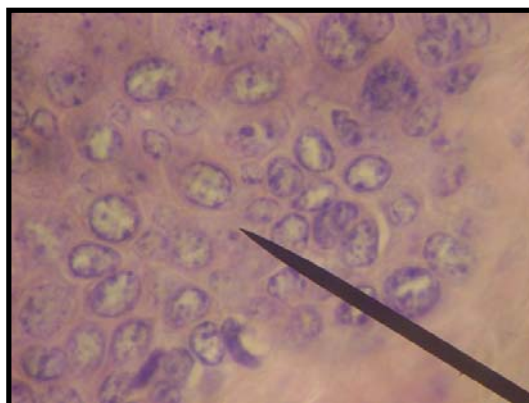


GRÁFICO Nº12: CORTE HISTOLÓGICO CORRESPONDIENTE AL LOMO DE RATON IRRADIADO CON TRATAMIENTO DEL EXTRACTO ACUOSO

**TABLA Nº 07.- EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE GELES A BASE DE
LOS EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess
EN RATONES A TRAVÉS DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA**

Días Control	0 (luego de UVC)	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º
Grupos de evaluación								
Control	Ligero eritema	Lesiones cóstricas	Lesiones Costro descamativas	Lesiones Costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Blanco	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal	Piel normal
Base gel	Ligero Eritema	Lesiones dérmicas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Gel base Metanol	Ligero Eritema	Eritema intenso	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Gel base Agua	Ligero Eritema	Ligero eritema	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Eritema Apenas perceptible	Eritema Apenas perceptible	Inicio remisión lesiones	Inicio remisión lesiones
Gel Extracto Total	Ligero Eritema	Lesiones dérmicas	Lesiones cóstricas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Eritema apenas perceptible	Eritema apenas perceptible
Gel base N- hexano	Ligero Eritema	Eritema intenso	Eritema intenso	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones costro descamativas	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas
Gel Dicloro metano	Ligero Eritema	Ligero Eritema	Lesiones cóstricas	Lesiones cóstricas	Eritema Apenas perceptible	Inicio Remisión lesiones	Remisión	Remisión

Fuente : Datos obtenidos del trabajo experimental.

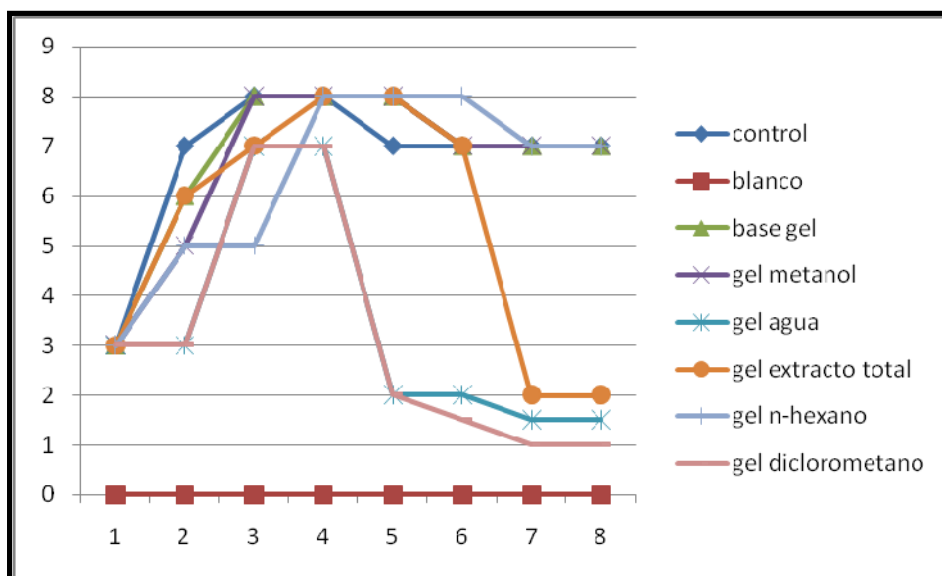


GRÁFICO N° 13.- COMPARACIÓN DE LA EVALUACIÓN CLÍNICA ENTRE LOS GELES A BASE DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

TABLA N° 08.- ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS GELES A BASE DE EXTRACTOS OBTENIDOS A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess EN RATONES.

Grupo de evaluación	Análisis histológico
Blanco (H)	Piel sin alteraciones microscópicas significativas.
Control	Hiperqueratosis leve.
Base gel (M)	Epidermis con patrón de reacción acantósico, con hiperplasia papilar e hiperqueratosis moderada. Queratinocitos apoptóticos en membrana basal. Infiltrado inflamatorio crónico leve.
Gel base-Metanol (C)	Epidermis con patrón de reacción acantósico, con

	<p>hiperplasia papilar e hiperqueratosis severa.</p> <p>Queratinocitos apoptóticos en membrana basal.</p> <p>Infiltrado inflamatorio crónico leve.</p>
Gel base-Agua (B)	<p>Foco de reacción acantósica e hiperqueratosis leve.</p> <p>Infiltrado inflamatorio leve en dermis superficial.</p>
Gel extracto total (T)	<p>Epidermis con patrón de reacción acantósico severa, con hiperplasia papilar, asociado a hiperqueratosis severa. Queratinocitos apoptóticos en membrana basal. Infiltrado inflamatorio crónico leve.</p>
Gel base – Diclorometano (N)	<p>Foco de acantosis e hiperqueratosis leve.</p>
Gel after sun patrón (P)	<p>Foco de acantosis e hiperqueratosis leve.</p>

Fuente : Datos obtenidos del trabajo experimental.

TABLA N°9.- ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL GEL A BASE DEL EXTRACTO DE DICLOROMETANO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri* Suess.

Análisis físico-químicos	Especificaciones	Resultados
Aspecto	Gel viscoso	Gel viscoso
Color	Verde oscuro	Verde oscuro
pH	5.5 – 7.0	6.50
Viscosidad sp N°7/20 rpm	40 000 – 72 000 cP	61 000 cP

Fuente : Datos obtenidos del trabajo experimental.

**TABLA Nº 10.- ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL GEL A BASE DEL
EXTRACTO DE DICLOROMETANO A PARTIR DE *Iresinee weberbaueri*
Suess.**

Análisis microbiológico	Especificaciones	Resultados
Recuento total de microorganismos aerobios	< 100 ufc/g	< 100 ufc/g
Recuento total de combinado de hongos filamentosos y levaduras	< 10 ufc/g	< 10 ufc/g
Patógenos	Ausente	Ausente

Fuente : Datos obtenidos del trabajo experimental.

DISCUSIÓN

Iresinee weberbaueri Suess es una especie de la que no se han reportado estudios químicos ni de actividad cosmética, sin embargo existen referencias bibliográficas de estudios botánicos. Se tiene solo por referencia de la medicina tradicional su uso como antiinflamatorio de las vías urinarias.

La recolección del material botánico se realizó en el mes de enero, luego de la etapa de lluvia y porque en esta época del año la planta está en periodo de floración, aspecto importante para la correcta clasificación taxonómica de la especie, y porque la parte de la planta a estudiar son las flores.

Se eligió como método de extracción la maceración, ya que este método se pudo extraer hasta agotamiento los metabolitos secundarios, además, que por ser una especie no estudiada no se sabe si algún metabolito secundario es sensible al calor.

Se realizó una marcha identificando metabolitos secundarios como: taninos, flavonoides, alcaloides, glicósidos y compuestos fenólicos. (Tabla N°03)

A partir del extracto etanólico se obtuvieron otros extractos con solventes de diferente polaridad como: n-hexano, diclorometano, metanol y acuoso. Siendo el extracto de diclorometano, el cual resultó el más activo en los ensayos biológicos. (Tabla N°05)

Todos los extractos obtenidos fueron sometidos al ensayo biológico de determinación de la Actividad regeneradora en eritema solar en animales de experimentación (ratones).

El ensayo de determinación de la Actividad regeneradora en eritema solar (con radiación de luz ultravioleta C) es el ensayo más adecuado utilizado para evaluar el efecto regenerador en animales de experimentación por presentar ventajas como: es un ensayo biológico validado, no necesita de equipos sofisticados, ni de reactivos costosos; además permite el trabajo con animales de experimentación pequeños.(26)

Se realizó ensayos preliminares para determinar la dosis adecuada para los extractos a trabajar, obteniéndose que sería de 15% por vía dérmica.

Se realizó un ensayo comparativo para determinar el grado de regeneración dérmica entre un gel cosmético comercial “after sun” y el gel a base del extracto de diclorometano, obteniéndose un resultado similar en análisis clínico y análisis histológico, teniendo en cuenta que el gel comercial posee más de un extracto vegetal en su composición, así como de otros insumos. (Tabla N°08)

Con respecto al gel a base del extracto total no se obtuvieron evidencias de regeneración dérmica al análisis histológico, por lo que se puede indicar que los metabolitos responsables de la actividad biológica deben ser aislados para poder evidenciar dicho efecto.

Se realizó también un ensayo para la determinación de sus propiedades físico químicas como aspecto, color, pH, y viscosidad, observándose que presenta el aspecto de un gel viscoso, un color que es naturalmente dado por el color original del extracto. El pH se encuentra en 6.5, valor cercano al pH normal de la piel, lo cual es importante para que no pueda causar irritaciones posteriores. La viscosidad se encontró en 61 000 cP, el cual le da una consistencia no muy viscosa, lo cual

coadyuva a una mejor aplicación sobre la piel, evitando el exceso de frotaciones sobre una piel dañada por el sol. (Tabla N°09)

Se realizó también un ensayo para la determinación de sus propiedades microbiológicas como Recuento total de microorganismos aerobios, Recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras y Presencia de patógenos, resultando que el producto no presentaba evidencia de contaminación microbiana. (Tabla N°10).

CONCLUSIONES

- 1.- La marcha fitoquímica de las flores de *Iresinee weberbaueri* Suess reportan la presencia de metabolitos secundarios tales como: taninos, flavonoides, alcaloides, glicósidos y compuestos fenólicos. Se determinó que los productos mayoritarios presentes en la fracción de diclorometano corresponde a estructuras de flavonoides.
- 2.- Al realizar los ensayos para la determinación del efecto regenerador dérmico por eritema solar de los extractos y los geles a base de las flores de *Iresinee weberbaueri* Suess: etanólico (total), n-hexano, diclorometano, metanol y acuoso, resultó el más activo el extracto de diclorometano según análisis por evaluación clínica, siendo confirmado por el análisis histológico, utilizando como dosis 15% de concentración en un vehículo de propilenglicol por vía dérmica.
- 3.- El efecto regenerador dérmico por eritema solar en animales de experimentación por el producto “after sun”: Aloha, presenta el mismo resultado luego del análisis histológico, que el presentado por el gel a base del extracto de diclorometano a partir de *Iresinee weberbaueri* Suess, según resultado luego del análisis histológico.
- 4.- Las características físico químicas resultantes del gel a base de diclorometano a partir de *Iresinee weberbaueri* Suess, para valor de pH fue de 6.5, el cual es cercano al valor del pH normal de la piel. Para el valor de viscosidad fue de 61 000 cP, el cual permite una fácil aplicación sobre la piel dañada.

5.- Las características microbiológicas resultantes del gel a base de diclorometano a partir de *Iresinee weberbaueri* Suess, para su valor de Recuento total de microorganismos aerobios fue menor a 10 ufc/g. Para su valor de Recuento total combinado de hongos filamentosos y levaduras fue de menor a 10 ufc/g. Para el análisis de presencia de patógenos fue de ausente. Los resultados microbiológicos obtenidos confirman que la formulación realizada es adecuada para obtener parámetros microbiológicos óptimos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Brack Egg A. Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles del Perú. Centros de Estudios Regionales Andinos Bartolomé de las Casas. Cuzco 1999.
- 2.- Exposición al sol que pueden causar manchas, dermatitis, alergias y cáncer a la piel. 2008. Disponible www.terra.com.pe/mujer/articulo/html/hof74521.htm
- 3.- Franco Romaní et al. Conocimientos, actitudes y prácticas sobre protección solar en Internos de Medicina de cinco hospitales generales de Lima y Callao. Disponible <http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1029-7332005000200002&script>
- 4.- Garcia B. Estudio Fitoquímico de la Iresine weberbaueri. UNMSM. 1994.
- 5.- Soukup J. Vocabulario de los nombres vulgares de la flora y catalogo de los géneros. Editorial Salesiana-Lima-Perú. 1987
- 6.- Juárez Ana et al. La Oscurana, one more relict forest to be conserved from the western Andean slopes in the northern Perú. 2005. Disponible <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BvRevistas/biología/v12.n2/pdf>
- 7.- Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos de estudios de productos naturales. Fondo Editorial PUCP. 2º Edición. Lima. 1994.
- 8.- Deanna Marcano – Masahisa Hasegawa. Orgánica. Universidad Central de Venezuela. Caracas.1991
- 9.- Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras J. Muñón.2002. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Rev. Nutr. Hosp. (2002) XVII (6) 271-278.

- 10.- Dominguez S, Xorge A. Métodos en la Investigación Fitoquímica; Primera Edición; Editorial Limusa. México. 1993
- 11.- Ballon M, Ferreyra M. Aislamiento e Identificación de Flavonoides de *C. melissifolia*. Tesis para optar el Título de Químico Farmacéutico, UNMSM, 1995
- 12.- Mabry T, Markam K, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Springer-Verlag. New York. 1970
- 13.- Serra-Baldrich E. Antioxidantes: Actualidad dermatológica. Universidad de Granada. 1994
- 14.- Roseeuw D. Anatomy and Physiology of skin and hair. Department of Dermatology AZ-Vrije Universiteit Brussel, B. 2008
- 15.- Marie- Claude M. Introducción a la Dermofarmacia y a la Cosmetología. Ed Acribia, S.A. España. p. 115-116. (2005)
- 16.- Pérez Damonte S. Protección solar. 2007.
- 17.- De los santos Carvallido C. Evolución conceptual en la prevención y tratamiento de la fotodermatosis. Presente y Futuro. Real Academia Nacional de Farmacia, Instituto de España. p. 75-102; 2003. Disponible <http://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4974617>
- 18.- Honeyman J. Efectos de las radiaciones ultravioleta en la piel. Rev. Peruana de dermatología Vol. 12 . N° 2 . 2002. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/dermatologia/v12_n2/efectos_radiaciones.htm
- 19.- Ulrich S. Modulation of immunity by ultraviolet radiation: key effects on antigen presentation. J Invest Dermatol 1995

- 20.- Norval M. Effects of solar radiation on the human immune system. En: PU Giacomoni, editor Sun protection in man. Amsterdam: Elsevier Sciences b.v. 2001
- 21.- Goihman-Yahr M. Skin photoaging: An outlook. Clin Dermatol 1996
- 22.- Carbonare MD, Pathak MA. Skin photosensitizing agents and the role of reactive oxygen species in photoaging. J Photobiochem Photobiol 1992
- 23.- Amblard P, Beani J, Reymond JL and cols. Photocarcinogenesis. Ann Dermatol Venereol 1987
- 24.- Llorens P. Control de la inflamación actínica mediante derivados del tocoferol. Actualidad Profesional. Editorial. OFFARM. Barcelona, 2006. Vol 25, Num 11. Disponible <http://www.controldeinflamacion/productosnaturales/20.htm>
- 25.- Lopez M. Fitocosmética solar. Actualidad Profesional. Editorial. OFFARM. Barcelona, 2007. Vol 26. Num 07. Disponible <http://www.fps/fitocosm%20etica%20solar.htm>
- 26.- Revista cubana de Farmacia. Modelo biológico para evaluar la acción fotoprotectora de un extracto de cordón umbilical humano. Disponible en: www.imbiomed.com.mx

ANEXOS

ANEXO N° 1

CLASIFICACIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE VEGETAL

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P N° 3796
Teléfono: 537 3629
e-mail: joricampos@yahoo.es



CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

José Ricardo Campos de la Cruz, Biólogo Colegiado, con registro N° 3796.

Certifica.

Que, la estudiante de Post Grado, Srta. **MARIANELLA ISABEL GUEVARA CASTILLA**.
Ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vernacular de "**flor blanca**". La muestra ha sido estudiada y determinada científicamente como ***Iresine weberbaueri*** Suess, y según el Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

DIVISIÓN	: MAGNOLIOPHYTA
CLASE	: MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE	: CARYOPHYLLIDAE
ORDEN	: CARYOPHYLLALES
FAMILIA	: AMARANTHACEAE
GENERO	: <i>Iresine</i> P. Browne
ESPECIE	: <i>Iresine weberbaueri</i> Suess.

Nombre vulgar: "CEDRÓN"

Se expide la presente certificación para fines que estime conveniente.

Lima, 03 de julio del 2007



José R. Campos de la Cruz
JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ
BIOLOGO
C.B.P. 3796

ANEXO N° 2

DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO POR ANÁLISIS HISTOLÓGICO

TRABAJO DE INVESTIGACION

DIAGNOSTICO MICROSCOPICO

PARTE I

- 1.- **GRUPO B.**- Preparado histológico sin alteraciones microscópicas significativas
- 2.- **GRUPO T.**- Al exámen microscópico se observa epidermis con patrón de reacción acantósica e hiperplasia papilar moderada focal; asociado a hiperqueratosis moderada. En dermis superficial se observa proliferación vascular con leve infiltrado linfocítico circundante.
- 3.- **GRUPO M.**- Epidermis con patrón de reacción acantósico e hiperqueratosis leve. En dermis superficial: infiltrado inflamatorio crónico perivascular.
- 4.- **GRUPO A.**- Epidermis con patrón de reacción acantósico e hiperqueratósico leve. Dermis sin alteraciones microscópicas significativas.
- 5.- **GRUPO E.**- Epidermis con patrón de reacción focalmente severo, con proyecciones "cupuliformes", asociado a moderada hiperqueratosis. Dermis papilar: con moderado infiltrado inflamatorio linfocítico, a predominio perivascular.



Dr. Rafael Mejía Jhang
ANATOMIA PATOLOGICA
C.RNP 34858

ANEXO N° 3

DIAGNÓSTICO MICROSCÓPICO POR ANÁLISIS HISTOLÓGICO

DIAGNOSTICO MICROSCOPICO

PARTE II

• **MUESTRA A.-**

- Foco de reacciòn acantòsica e hiperqueratosis leve.
- Dermis superficial y profunda: sin alteraciones microscòpicas significativas.

• **MUESTRA B.-**

- Foco de reacciòn acantòsica e hiperqueratosis leve.
- Infiltrado inflamatorio crònico leve en dermis superficial.
-

• **MUESTRA C.-**

- Epidermis con patròn de reacciòn acantòsico, con hiperplasia papilar e hiperqueratosis severa
- Queratinocitos apoptòticos en membrana basal.
- Infiltrado inflamatorio crònico leve.

• **MUESTRA D.-**

- Epidermis con patròn de reacciòn acantòsico, con hiperplasia papilar e hiperqueratosis severa.
- Queratinocitos apoptòticos en membrana basal.
- Infiltrado inflamatorio crònico moderado/severo.

MUESTRA H.-

- Piel sin alteraciones microscòpicas significativas.

• **MUESTRA M.-**

- Epidermis con patròn de reacciòn acantòsico, con hiperplasia papilar e hiperqueratosis moderada.
- Queratinocitos apoptòticos en membrana basal.
- Infiltrado inflamatorio crònico leve.

MUESTRA N.-

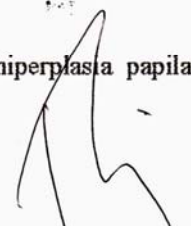
- Foco de acantòsis e hiperqueratosis leve.

• **MUESTRA P.-**

- Foco de acantòsis e hiperqueratosis leve.

• **MUESTRA T.-**

- Epidermis con patròn de reacciòn acantòsico severa, con hiperplasia papilar, asociado a hiperqueratosis severa.
- Queratinocitos apoptòticos en membrana basal.
- Infiltrado inflamatorio crònico leve.


Dr. Rafael Mejía Jhang
ANATOMIA PATOLOGICA
C.M.P. 34868